Aus der Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Hochschule Hannover,
angefertigt im Rahmen der strukturierten Doktorandenausbildung StrucMed

---

Endothelialisierung polymerer Gasaustausch-Hohlfasermembranen und konsekutive Analyse der Membranbesiedlung unter dynamischen Bedingungen

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin
in der
Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Ulrich Zwirner
aus
Hildesheim

Hannover 2016

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am 08.11.2016.
Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover.

Präsident:	Prof. Dr. med. Christopher Baum
Betreuer:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. Axel Haverich
Kobetreuerin:	Dr. med. Bettina Wiegmann
Referent:	Prof. Dr. med. Daniel Sedding
Korreferent:	Prof. Dr. med. Christian Mühlfeld
Tag der mündlichen Prüfung:	11.04.2017
Promotionsausschussmitglieder:	Prof. Dr. med. Tobias Welte
	Prof. Dr. med. Carlos Guzmán
	PD Dr. med. Frank Gossé

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **5**

1 Einleitung **8**

2 Theoretische Grundlagen **13**
2.1 Extrakorporale Lungenunterstützung 13
2.1.1 Technik, Betriebsmodi und verwendete Polymere 13
2.1.2 Klinischer Einsatz und Komplikationen 15
2.2 Hämokompatibilität und Biologisierung artifizieller Oberflächen 17
2.2.1 Oberflächeninduzierte Blutgerinnung 17
2.2.2 Ansätze zur Optimierung der Hämokompatibilität 19
2.3 Eignung von Zellen zur Oberflächenendothelialisierung 20
2.3.1 Der endotheliale Phänotyp 20
2.3.2 Endotheliale Progenitorzellen 21
2.3.3 Aktivierungszustand und Funktionalität 24
2.3.4 Scherstressabhängige Modifikation des Expressionsprofils 26
2.4 Design bioartifizieller Lungenunterstützungssysteme 27
2.4.1 Zentrale Fragen und Vorgehensweise dieser Arbeit 30

3 Material und Methoden **32**
3.1 Materialien und Geräte 32
3.2 Zellkultur 32
3.2.1 Isolation endothelialer koloniebildender Zellen 32
3.2.2 Expansion und serielle Passagierung 33
3.2.3 Kryokonservierung 34
3.3 Phänotypisierung langzeitexpandierter hCB-ECFCs 34
3.3.1 RNA-Extraktion 34
3.3.1.1 Aussaat und Lyse 34
3.3.1.2 RNA-Isolation aus den Lysaten 35
3.3.2 Synthese der komplementären DNA 36
3.3.3 Kontrolle des Syntheseerfolges 36
3.3.4 Untersuchung der Expression endothelialer Marker 38
3.4 Hohlfasermembran-Endothelialisierung 39
3.4.1 Membrantypen 39
3.4.2 Endothelialisierung über sechs Tage 40
3.4.3 Inkubation zellfreier Oxyplus$^{A/H}$-Kontrollmembranen 43
3.4.4 Langzeit-Endothelialisierung über vier Wochen 43
3.5 Färbung und Fluoreszenzmikroskopie 44

3.5.1 Vitalfärbung (Calcein-AM) . . . 45
3.5.2 Kernfärbung (Hoechst 33342) . . . 45
3.5.3 Proteinfärbung (TAMRA) . . . 45
3.6 Quantifikation und Prozessierung der adhärenten hCB-ECFCs . . . 45
3.6.1 Zählung der adhärenten Zellen . . . 46
3.6.2 Aufarbeitung für semiquantitative realtime-PCR . . . 46
3.7 Untersuchung des zellulären mRNA-Expressionsprofils . . . 46
3.7.1 Relative Quantifikation nach Pfaffl . . . 48
3.8 Stimulation endothelialisierter PMP-HFMs mit rhuTNF-α . . . 49
3.9 Analyse unter dynamischen Bedingungen (Flussexposition) . . . 49
3.9.1 Flusskammersystem . . . 50
3.9.2 Endothelialisierung der HFM-Patches . . . 52
3.9.3 Flussexpositionsprotokolle . . . 52
3.9.4 Auswertung . . . 53
3.9.4.1 Qualitative Analyse . . . 53
3.9.4.2 Quantitative Analyse . . . 54
3.9.4.3 Molekularbiologische Analyse . . . 54
3.9.5 Flusskonditionierung . . . 55
3.10 Statistik . . . 55

4 Ergebnisse **56**
4.1 Expansion und Charakterisierung der hCB-ECFCs . . . 56
4.1.1 Routine-Zellkultur . . . 56
4.1.2 Expression endothelialer Marker nach Langzeitexpansion . . . 56
4.2 Endothelialisierung polymerer Gasaustausch-HFMs . . . 57
4.2.1 Vergleich unterschiedlicher HFM-Typen und Kulturprotokolle nach sechstägiger Endothelialisierung . . . 57
4.2.2 Qualitative Analyse der Zell- und der Proteinschicht auf Oxyplus$^{A/H}$-HFMs im Seitenvergleich . . . 62
4.2.2.1 Analyse der endothelialen Zellschicht . . . 62
4.2.2.2 Analyse der Albumin / Heparin-Beschichtung . . . 62
4.2.3 Vergleich unterschiedlicher HFM-Typen nach Langzeit-Endothelialisierung über vier Wochen . . . 65
4.2.4 Analyse des Aktivierungszustandes der hCB-ECFCs nach Kultivierung auf polymeren HFMs . . . 70
4.2.5 Analyse der proinflammatorischen Aktivierbarkeit der hCB-ECFCs nach Kultivierung auf PMP-HFMs . . . 74
4.3 Zwischenfazit . . . 75
4.4 Flussexposition endothelialisierter Oxyplus$^{A/H}$-HFMs . . . 76
4.4.1 Adhäsion der hCB-ECFCs nach Flussexposition . . . 76

4.4.2 Zelluläre mRNA-Expression nach Flussexposition 79
4.4.3 Flusskonditionierung 81
4.5 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse 83

5 Diskussion **84**
5.1 ECFCs als autologe Zellquelle 85
5.2 Endothelialisierung polymerer Gasaustausch-HFMs 88
5.3 Aktivierungszustand der Zellen nach Endothelialisierung und nach Zytokinstimulation 93
5.4 Flussexposition endothelialisierter Oxyplus$^{A/H}$-HFMs 97
5.5 Aktivierungszustand der Zellen nach Flussexposition 100
5.6 Fazit und Ausblick 103

6 Zusammenfassung **107**

7 Abstract **109**

8 Literaturverzeichnis **111**

9 Anhang **123**
9.1 Materiallisten 123
9.1.1 Laborgeräte 123
9.1.2 Hohlfasermembranen 124
9.1.3 Reagenzien und Medien 125
9.1.4 Verbrauchsmaterialien 126
9.2 Abbildungsverzeichnis 127
9.3 Tabellenverzeichnis 128
9.4 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit 129
9.5 Lebenslauf 130
9.6 Erklärung nach §2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 der Promotionsordnung 131
9.7 Danksagung 132

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
acLDL	acetyliertes Low Density Lipoprotein
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CAM	Cellular Adhesion Molecule
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
cRGD	cyclic RGD
Ct	Cycle threshold
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d	Tag
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EBM-2	Endothelial Basal Medium - 2
ECFC	Endothelial Colony - Forming Cell
ECLA	Extracorporeal Lung Assist
ECMO	Extracorporale Membranoxygenation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGM-2	Endothelial Growth Medium - 2
ELAM-1	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule - 1
EMAP-2	Endothelial / Macrophage Activating Polypeptide - 2
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
EPC	Endothelial Progenitor Cell
ET-1	Endothelin - 1
et al.	et alii

EVLP	Ex Vivo Lung Perfusion
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetale Calf Serum
flk-1	fetale liver kinase - 1
flt-1	fms-like tyrosine kinase - 1
frt	fms-related tyrosine kinase
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GP	Glykoprotein
h	Stunde
hAPB-ECFC	human Adult Peripheral Blood - derived ECFC
hCB-ECFC	human Cord Blood - derived ECFC
hEGF	human Epidermal Growth Factor
hFGF-B	human Fibroblast Growth Factor - B
HFM	Hohlfasermembran
HLA	human leukocyte antigen
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule - 1
IE	Internationale Einheit
iLA	interventional Lung Assist
KDR	Kinase-insert Domain Receptor
KLF-2	Krüppel-Like Factor - 2
KR	Kurze Rotationszeit (24 h Rotationsphase)
L	Liter
LAS	Lung Allocation Score
LKLF	Lung Krüppel-Like Factor
LR	Lange Rotationszeit (120 h Rotationsphase)
LTx	Lungentransplantation
m	Meter
M	mol / Liter
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NFκB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells
NO	Stickstoffmonoxid
OCS	Organ Care System
OEC	Outgrowth Endothelial Cell
P	Passage
p.a.	pro analysi
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Population Doubling
PECAM-1	Platelet Endothelial Cellular Adhesion Molecule - 1
PGD	Primary Graft Dysfunction
pH	potentia Hydrogenii
PMP	Poly(4-methyl-1-penten)
PP	Polypropylen
qPCR	semiquantitative realtime Polymerase Chain Reaction
R3-IGF-1	R3 - Insulin-like Growth Factor - 1
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
rhuTNF-α	rekombinanter humaner Tumornekrosefaktor - α
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde
sog.	sogenannte(r)
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan - Acetat - EDTA
TAMRA	5-(und-6)-Carboxy-tetramethylrhodamin - Succinimidylester
tek	tunica endothelial kinase
TF	Tissue Factor
tie	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and egf-like domains
TM	Thrombomodulin
TNF-α	Tumornekrosefaktor - α
U	Unit
UEA-1	Ulex Europaeus Agglutinin - 1
V	Volt
VCAM-1	Vascular Cellular Adhesion Molecule - 1
VEcad	Vascular Endothelial cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vWF	von Willebrand - Faktor
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die regenerative Medizin strebt neben einer Wiederherstellung gestörter Organfunktionen auch den biologischen Ersatz irreparabel geschädigter Gewebe und Organe an. Da eine Transplantation bei terminalem Organversagen gegenwärtig die einzige kurative Therapieoption darstellt, gleichzeitig aber ein andauernder Mangel an Spenderorganen besteht, könnten insbesondere Patienten, die auf ein geeignetes Transplantat warten, von einem solchen Orgenersatz profitieren. Es ist zwar noch nicht möglich, implantierbare solide Organe *in vitro* herzustellen, jedoch sind über die letzten Jahrzehnte technische Verfahren entwickelt worden, um die Überlebenszeit terminal organgeschädigter Patienten zu verlängern, bis möglicherweise ein Spenderorgan verfügbar ist (sog. *bridge-to-transplant*). Zunehmend werden die hierfür verwendeten Technologien auch als langfristige Alternative zur Transplantation (sog. *destination therapy*) eingesetzt: Neben der Dialyse als etabliertem Nierenersatzverfahren stehen z.B. implantierbare ventrikuläre Unterstützungssysteme zur Verfügung, die eine insuffiziente Pumpfunktion des Herzens über Jahre hinweg kompensieren können [1, 2]. Demgegenüber gibt es noch kein vergleichbares System zur prolongierten Unterstützung oder zum dauerhaften Funktionsersatz der Lunge [3, 4]. Die oft irreversibel fortschreitende respiratorische Insuffizienz im Endstadium chronischer pulmonaler Erkrankungen kann zum jetzigen Zeitpunkt deshalb nur durch eine Allotransplantation der Lunge behoben werden [4].

Gegenüber den anderen soliden Organen stellt die Lungentransplantation (LTx) eines der jüngsten Transplantationsverfahren dar. Zwar ist die weltweit erste Einzellungentransplantation am Menschen bereits 1963 erfolgt, doch erst die Einführung des Ciclosporins in den frühen Achtzigerjahren hat dauerhafte Erfolge ermöglicht [5, 6]. Die erste erfolgreiche LTx in Deutschland ist 1988 in Hannover durchgeführt worden [6]. Seit diesen frühen Operationen kann eine kontinuierliche Zunahme insbesondere der bilateralen LTx-Eingriffe verzeichnet werden; im Jahr 2011 sind weltweit insgesamt 3 725 Transplantationen erfolgt [7]. Dies entspricht einem Anstieg um 117% binnen zehn Jahren [7]. Während der letzten Jahre scheint dieser kontinuierliche Zuwachs erstmals zu stagnieren: In ihrem Jahresbericht von Oktober 2014 hat die Internationale Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation insgesamt 3 719 LTx-Operationen für das Jahr 2012 registriert [7]. Die führenden LTx-Indikationen sind das Lungenemphysem bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (*chronic obstructary pulmonary disease*, COPD), die idiopathische Lungenfibrose sowie die Cystische Fibrose, welche zusammen fast drei Viertel aller Fälle ausmachen (siehe Tabelle 1). Obwohl dabei der Anteil des COPD-induzierten Emphysems in den letzten Jahren abgenommen hat [7, 8], ist es seit über einem Jahrzehnt die häufigste Ursache des terminalen Lungenversagens bei chronischer Lungenkrankheit [4, 6, 9] und stellt weltweit nach wie vor in etwa einem Drittel der Fälle die ausschlaggebende Grunderkrankung LTx-bedürftiger Patienten dar [7].

Diagnose	Anteil an LTx-Prozeduren
COPD	32,6%
Interstitielle Lungenerkrankungen	24,3%
Cystische Fibrose	16,4%
α_1-Antitrypsin-Mangel	5,6%
Sekundäre Lungenfibrose	3,9%
Pulmonalarterielle Hypertonie	3,8%
Bronchiektasen	2,7%
Sarkoidose	2,5%
Andere	5,5%
Re-Transplantationen	2,7%

Tab. 1: Übersicht der weltweit häufigsten LTx-Indikationen bei Erwachsenen im Zeitraum 1995 – 2012. Vereinfachte Darstellung nach [7].

Durch Optimierung der Operationsmethoden, der peri- und postoperativen Patientenversorgung sowie der Langzeittherapie (z.B. im Bereich der Immunsuppression) hat sich die Prognose lungentransplantierter Patienten kontinuierlich verbessert. Über die letzten zehn Jahre sind so eine Zunahme der Ein-Jahres-Überlebensrate von 78% auf 90% sowie eine Zunahme der Fünf-Jahres-Überlebensrate von 45% auf 53% beobachtet worden [6–9]. Trotz aller Erfolge gibt es hinsichtlich der LTx aber nach wie vor eine zentrale Herausforderung: Dem bereits erwähnten Mangel an alternativen Therapieoptionen steht ein hoher Bedarf an Spenderlungen gegenüber, welcher durch das Angebot nicht gedeckt werden kann. Laut der Deutschen Stiftung Organtransplantation waren am 31. Dezember 2014 in Deutschland 432 Patienten zur LTx gelistet, wobei die Zahl der 2014 erfolgten Neuanmeldungen (430) die erfolgten Transplantationen (352) übertroffen hat [10]. Die Anzahl potentieller Empfänger, welche von einer LTx profitieren könnten, wird durch einige Autoren erheblich größer eingeschätzt [6]. Darüber hinaus hat die Bereitschaft der Bevölkerung zur Organspende infolge des Transplantationsskandals von 2012 erheblich abgenommen [11]. Die ohnehin mangelhafte Verfügbarkeit von Spenderorganen wird zusätzlich durch die Tatsache verschärft, dass nur eine geringe Zahl der Organspender auch als Lungenspender geeignet ist [6, 12]. Bei 882 Organspenden, die 2014 in Deutschland erfolgt sind, ist es nur in 316 Fällen (entsprechend 35,8%) möglich gewesen, die Spenderlungen zur LTx zu verwenden [13]. Im gesamten Eurotransplant-Raum liegt diese Zahl sogar bei nur 28,8% [13]. Die Wartezeit auf eine LTx ist entsprechend lang: 59% der in Deutschland gelisteten Patienten warten mindestens ein Jahr und 42% zwei Jahre oder länger auf ein Transplantat [13]. Infolgedessen wird auf unterschiedliche Arten versucht, die Wartelistensterblichkeit, die vor einigen Jahren noch ca. 20% im ersten und ca. 40% im zweiten Jahr betragen hat [14, 15], zu reduzieren. Unter anderem ist Ende 2011 ein neuer Allokationsmechanismus, der sog. *Lung Allocation Score* (LAS), eingeführt worden. Der LAS ist abhängig von klinischen Parametern wie Patientenalter, Body Mass Index, Grunddiagnose oder CO_2-Partialdruck im Blut und weist jedem wartenden Patienten einen

Punktwert von 0 bis 100 zu, der mit der Dringlichkeit der LTx korreliert [16]. Zwar konnte die Einführung des LAS zu einer Reduktion der Wartelistensterblichkeit beitragen [17, 18], doch nach wie vor beträgt die Mortalität der LTx-gelisteten Patienten in Deutschland ca. 16% pro Jahr – d.h., etwa jeder sechste Patient auf der Warteliste verstirbt in Ermangelung einer geeigneten Spenderlunge [16, 19].

Um trotzdem eine möglichst große Zahl der terminal lungenkranken Patienten transplantieren zu können, werden zunehmend auch marginale Spenderorgane eingesetzt, zum Beispiel von älteren oder polytraumatisierten Spendern [20–22], während im Ausland Lungen von sog. *non - heart beating donors*, d.h. herztoten Spendern, als zusätzliche Ressource rekrutiert werden [6]. Lebendspenden sind ebenfalls durchgeführt worden – lange Zeit vor allem in den USA und Japan [6], im April 2012 aber erstmals auch in Deutschland (Hannover). Eine zusätzliche Erweiterung des Organpools erhofft man sich von der sog. *Ex Vivo Lung Perfusion* (EVLP), die eine normotherme Perfusion und Ventilation der explantierten Lungen gestattet und so eine extrakorporale Konsolidierung oder direkte Behandlung marginaler bzw. vorgeschädigter Spenderlungen ermöglichen kann [23–25]. Den nächsten Entwicklungsschritt stellt das sog. *Orcan Care System* (OCS) dar: Als transportables EVLP-System könnte es – zusätzlich zu den genannten Vorteilen [26, 27] – durch eine Verkürzung der kalten Ischämiezeit auch die Auswirkungen des Reperfusionsschadens mindern sowie die geographische Flexibilität des Organtransports erhöhen [28]. Trotz all dieser Entwicklungen herrscht aber Einigkeit darüber, dass auf absehbare Zeit keine dem Bedarf entsprechende Versorgung mit geeigneten Spenderlungen möglich sein wird [14].

In diesem Spannungsfeld erlangt die Entwicklung eines verbesserten, d.h. langfristig anwendbaren Lungenunterstützungsverfahrens besondere Relevanz. Verschiedene Methoden der extrakorporalen Lungenunterstützung (*extracorporeal lung assist*, ECLA) sind derzeit in Gebrauch, um bei Lungenversagen einen suffizienten Gasaustausch zu gewährleisten, wenn dies durch konventionelle Beatmungstechniken nicht mehr möglich ist – sowohl unter Akutbedingungen als auch im Endstadium chronischer Lungenerkrankungen oder bei Transplantatabstoßung. Etwa 7% aller europäischen LTx-Patienten sind auf eine Überbrückung durch ECLA angewiesen, während sie auf ein Spenderorgan warten [14]. Sämtlichen ECLA-Verfahren ist gemein, dass sie der Intensivmedizin vorbehalten sind [6] und die unzureichende Lungenfunktion des Patienten trotz aller technischen Fortschritte der letzten Jahre maximal für einige Wochen bis hin zu wenigen Monaten kompensieren können [3]. Dies erklärt sich durch das zentrale Funktionsprinzip der ECLA: Der Gasaustausch erfolgt – wie auch in der Lunge – *per diffusionem*, jedoch über Kunststoffmembranen. Das Patientenblut steht so in ständigem Kontakt mit synthetischen Oberflächen, was häufig zu inflammatorischen Prozessen und einer Aktivierung der Blutgerinnung mit konsekutiver Thrombenbildung führt. Da man derartigen Gerinnungskomplikationen mit einer Heparinisierung der Patienten entgegenzuwirken versucht, sind zudem schwere Blutungsereignisse möglich [29, 30].

Durch eine Zusammenführung der etablierten Membranoxygenationstechnologie mit den Prinzipien der regenerativen Medizin ist die Entwicklung einer artifiziellen Lunge mit längerfristiger oder dauerhafter Anwendungszeit denkbar: In einem biohybriden Ansatz soll durch Besiedlung der Gasaustauschmembranen mit humanen Endothelzellen (sog. Endothelialisierung) eine Biologisierung der synthetischen Oberflächen erreicht werden [31]. Die verbesserte Hämokompatibilität eines solchen Lungenunterstützungssystems könnte es zunächst ermöglichen, die Überlebenszeit der terminal lungengeschädigten Patienten bei gleichzeitiger Reduktion der inflammations- bzw. koagulationsassoziierten Komplikationen zu verlängern, während die Patienten auf eine LTx warten. Das eigentliche Ziel des Projektes liegt jedoch in der Entwicklung eines implantierbaren Systems, welches als *destination therapy* eingesetzt werden kann. Diese sog. Biohybridlunge soll durch Kombination technischer und biologischer Mittel den pulmonalen Gasaustausch über Monate bis Jahre hinweg sicher unterstützen oder ganz ersetzen können – vergleichbar einer Kompensation der Pumpfunktion eines insuffizienten Herzens durch moderne, implantierbare Herzunterstützungssysteme. Auf diesem Wege ließe sich in Zukunft möglicherweise ein Großteil der Patienten behandeln, die gegenwärtig in Ermangelung einer Spenderlunge versterben. Auch Patienten, die auf Grund ihres Alters oder ihrer Begleiterkrankungen nicht für eine LTx geeignet sind, könnten von der Biohybridlunge als möglicher Alternative zur Transplantation profitieren. Ein vollständig implantierbares System lässt zusätzliche Vorteile erhoffen: Neben dem Fehlen von Eintrittspforten für Infektionen könnte insbesondere ein Erhalt der Mobilität zu einer verbesserten Lebensqualität und einer geringeren Hospitalisierungsrate der Patienten beitragen.

Vorausgehende Machbarkeitsstudien am zweidimensionalen Modell haben gezeigt, dass es möglich ist, Polymerfolien mit endothelialen Zellen zu besiedeln [32]. Auch eine dreidimensionale Endothelialisierung polymerer Hohlfasermembranen (HFMs) ist im Rahmen vorausgehender Versuche zu der vorliegenden Arbeit bereits erfolgreich durchgeführt worden [33]. Das Ziel dieser Arbeit ist es, unterschiedliche Typen von polymeren Gasaustausch-HFMs auf ihre Eignung als dreidimensionale Gerüststruktur einer endothelialisierten Biohybridlunge hin zu testen. Dabei werden nur solche HFM-Typen untersucht, die auch in klinisch eingesetzten Oxygenatorsystemen Anwendung finden. Darüber hinaus wird durch einen Vergleich verschiedener Kulturprotokolle versucht, die Besiedlung der unterschiedlichen Membrantypen zu optimieren, während durch eine molekularbiologische Analyse der zellulären Transkription die Reaktion der verwendeten Zellen auf die synthetischen Oberflächen und die Kulturbedingungen evaluiert wird. Bei allen Experimenten im ersten Teil dieser Dissertation steht die Identifikation einer hinsichtlich des Endothelialisierungsergebnisses möglichst idealen Kombination aus HFM-Typ und Kulturprotokoll im Zentrum des Interesses, da diese als Ausgangspunkt für konsekutive Versuche einen entscheidenden Schritt in der Entwicklung der Biohybridlunge markiert. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird ein solches Anschlussexperiment durchgeführt: Weil die endothelialisierten Gasaustausch-HFMs im späteren klinischen Einsatz den vom

Blutstrom hervorgerufenen Scherbelastungen standhalten können müssen, werden die zuvor endothelialisierten Membranen in einem maßangefertigten Bioreaktor unter definierten Volumenflussbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgen eine erneute Untersuchung der Adhärenz sowie eine weitere molekularbiologische Charakterisierung der endothelialen Zellschicht auf den HFMs. In Anbetracht der hierbei gewonnenen Erkenntnisse wird zusätzlich versucht, die Zahl der adhärenten Zellen unter Flussbedingungen durch eine schrittweise Adaptation an den Fluss des Kulturmediums zu steigern.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Extrakorporale Lungenunterstützung

Über die letzten Jahrzehnte sind verschiedene Methoden entwickelt worden, um eine terminale Lungeninsuffizienz medikamentös und apparativ zu kompensieren. Technische Unterstützungssysteme, die auf einem extrakorporalen Kreislauf basieren, kommen dabei zum Einsatz, wenn Pharmakotherapie und konventionelle Beatmung keinen suffizienten Gasaustausch mehr gewährleisten können. Obwohl die Verwendungszeit dieser Systeme derzeit eingeschränkt ist [3], ist vorstellbar, sie als Entwicklungsgrundlage eines über Jahre hinweg einsetzbaren Lungenunterstützungssystems zu nutzen.

2.1.1 Technik, Betriebsmodi und verwendete Polymere

Die Funktionalität moderner Oxygenatoren – und damit auch der geplanten Biohybridlunge – beruht auf einem diffusiven Gasaustausch, der über Hohlfasern aus thermoplastischem Polymer erfolgt [34]. Dabei dient das Lumen der Fasern als Kompartiment für die externe Gaszufuhr, während auf der Außenseite die Sauerstoffträger des Blutes zahlreiche Lagen von HFMs passieren (Abbildung 1). So entsteht für den Gasaustausch eine effektive Oberfläche, die in Oxygenatoren für Erwachsene etwa 1,3 – 1,8 m^2 misst [29, 35–37], z.B. in pädiatrischen Oxygenatormodellen aber auch kleiner ausfallen kann.

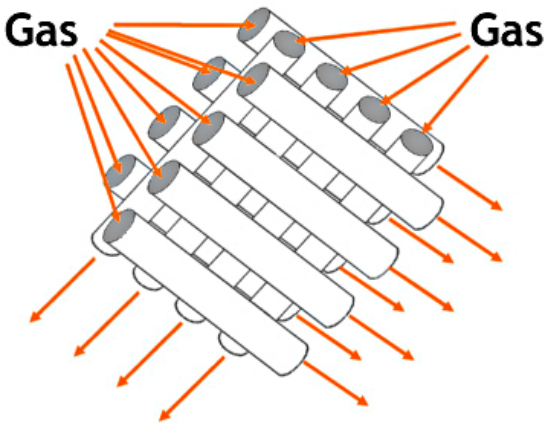


Abb. 1: Schematischer Aufbau einer Gasaustausch-Hohlfasermembran. Originalabbildung zur Verfügung gestellt und Verwendung genehmigt von Dr. C. Hess.

Die Nomenklatur der ECLA-Systeme erfolgt in der Literatur nicht einheitlich. Während im klinischen Alltag vor allem anhand des Betriebsmodus (z.B. veno-venös oder veno-arteriell) differenziert wird, ziehen einige Autoren als Kriterium zur Klassifikation von

Lungenunterstützungssystemen auch die Notwendigkeit einer Pumpe heran [34, 36, 38]. Pumpengestützte Verfahren, z.B. die extrakorporale Membranoxygenation (ECMO) oder Herz-Lungen-Maschinen, werden in einem veno-venösen oder veno-arteriellen Modus betrieben [3]. Die früher verwendeten Rollerpumpen sind dabei zunehmend von Zentrifugalpumpen abgelöst worden, denen man eine geringere Traumatisierung der Blutzellen zuschreibt [36]. Demgegenüber erlauben pumpenlose Oxygenatorsysteme lediglich einen arterio-venösen Betrieb. Bei dieser Betriebsweise erfolgt die Perfusion des extrakorporalen Kreislaufs allein durch den systemischen Blutdruck des Patienten mit einem theoretisch möglichen Blutfluss von 0,5 – 4,5 L/min [29]. Der klinisch erreichte Blutfluss ist deutlich geringer: Abhängig von den individuellen Kreislaufparametern des Patienten, z.B. der Auswurfleistung des Herzens oder dem systemischen Gefäßwiderstand, liegt dieser meist um 1,0 – 1,5 L/min [36]. Ein arterio-venöser Betrieb wird erst durch den sehr geringen Flusswiderstand des eingesetzten Oxygenators möglich [3]; ein arterieller Mitteldruck von mindestens 70 – 80 mmHg ist allerdings Voraussetzung für die Verwendung eines pumpenlosen Systems [29, 34]. Der erste hierfür ausgelegte Oxygenator auf dem Markt ist das interventionelle Lungenunterstützungssystem (*interventional lung assist*, iLA) der Firma Novalung gewesen, das im arterio-venösen Modus primär für die Elimination von CO_2 bei Hyperkapnie ausgelegt ist [3, 34, 36]. Nachfolgend ist durch einige Autoren versucht worden, eine einheitliche Nomenklatur der ECLA-Systeme zu schaffen, indem sie den Begriff ECMO für pumpengestützte und den Begriff iLA für pumpenlose Systeme verwendetet haben [3, 38]. Da es aber auch möglich ist, die Oxygenationsleistung von iLA-Oxygenatoren durch einen pumpenunterstützten Betrieb im veno-venösen oder veno-arteriellen Modus zu steigern [35], hat sich diese Terminologie nicht durchgesetzt.

Zur Herstellung der HFMs werden unterschiedliche Kunststoffe eingesetzt: Lange Zeit haben mikroporöse Hohlfasern aus hydrophobem Polypropylen (PP) mit einer Dichte von 0,90 – 0,92 g/cm^3 als Polymer der Wahl gedient [30]. Im klinischen Einsatz kommt es bei Verwendung dieses Materials aber nahezu immer zu einer Leckage von Plasma über die Membranen (sog. *plasma weeping*), wodurch die Gasaustauschleistung stark sinkt und ein häufiger Oxygenatorwechsel obligat wird [30, 36]. Ursächlich scheint eine Adsorption bipolarer Moleküle (z.B. Phospholipide) aus dem Patientenblut zu sein, auf Grund derer die Hydrophobizität des PPs und damit die Abstoßung des Plasmawassers von Oberfläche und Mikroporen der Gasaustauschmembranen reduziert wird [39]. Neuere Oxygenatoren inklusive des iLA-Modells (Abbildung 2) nutzen daher HFMs aus Poly(4-methyl-1-penten) (PMP), das auf Grund seiner niedrigen Dichte von 0,835 g/cm^3 eine hochgradige Permeabilität für Gase aufweist [32] und in Form nicht-poröser HFMs in Oxygenatoren mit sehr geringem Flusswiderstand eingesetzt wird [30, 34–36]. Obwohl es im Einzelfall auch bei der Verwendung eines auf PMP basierenden Oxygenatorsystems zur Leckage von Plasma kommen kann [40], scheint dieses Problem bei Verwendung nicht-poröser PMP-HFMs im Allgemeinen nur sehr selten aufzutreten [34]. Weitere Verbesserungen erhofft man sich von einer antithrombogenen Beschichtung der Hohlfasern mit Albumin und Heparin.

Der definitive klinische Nutzen dieser Maßnahme ist bisher zwar noch nicht im Rahmen kontrollierter Studien belegt worden [41], es zeichnet sich aber eine Verlängerung der maximalen Einsatzdauer des Oxygenators auf mehrere Wochen bei gleichzeitiger Reduktion der Thrombusformation im Oxygenator ab [3, 30]. Eine systemische Heparinisierung des Patienten ist allerdings auch bei Verwendung moderner, auf PMP-HFMs basierender Oxygenatorsysteme notwendig [36]. Im Tierversuch ist die Überlegenheit derartiger Oxygenatoren gegenüber PP und anderen Materialien bereits bestätigt worden [42]. Mit einer speziell modifizierten Heparin-Beschichtung ist dabei auch ein suffizienter extrakorporaler Gasaustausch für mehr als 20 Wochen ohne Anhalt für Plasmaleckagen oder signifikante Thrombenbildung möglich gewesen [37].



Abb. 2: iLA-Membranoxygenator (Firma Novalung) mit 1,3 m^2 Oberfläche zum Gasaustausch; HFM-Polymer ist Albumin / Heparin-beschichtetes PMP. Originalabbildung zur Verfügung gestellt und Abdruckgenehmigung erteilt durch die Xenios AG, Heilbronn, am 18.04.2017.

2.1.2 Klinischer Einsatz und Komplikationen

Trotz dieser Fortschritte handelt es sich bei allen ECLA-Maßnahmen um intensivmedizinische Verfahren, deren Einsatzmöglichkeiten noch zu limitiert sind, um als dauerhafte Alternative zur LTx im Sinne einer *destination therapy* in Frage zu kommen. Hauptziel ist vielmehr eine Lungenprotektion durch temporäre Unterstützung des Gasaustausches [30], wodurch am künstlich beatmeten Patienten ein schonenderes Beatmungsregime ermöglicht und Schäden durch hohe Beatmungsdrücke vermieden werden können. Die Nutzung derartiger Lungenunterstützungsverfahren beschränkt sich im klinischen Alltag auf zeitlich befristete Indikationen: Überbrückung bis zur LTx bei terminaler respiratorischer Insuffizienz [3, 29, 35, 43], Überbrückung bis zur Erholung der Lunge bei akutem Lungenversa-

gen (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) oder schwerwiegendem Primärversagen eines Transplantats (*primary graft dysfunction*, PGD) [34, 44] sowie perioperative Lungenunterstützung [38, 44]. Während die pumpenlose, arterio-venöse iLA erfolgreich zur Hyperkapnietherapie eingesetzt wird [29, 43], lässt sich eine ausgeprägte Hypoxämie nur durch pumpenunterstützte Verfahren effektiv behandeln [35]. Dies kann beispielsweise im Rahmen eines schrittweise eskalativen Therapiealgorithmus umgesetzt werden, bei dem die invasiveren, pumpenunterstützten Verfahren erst dann zum Einsatz kommen, wenn eine Hyperkapnie- und Azidose-Korrektur allein nicht mehr ausreicht, um das Überleben des Patienten zu gewährleisten [3]. Die Vorteile der ECLA-Anwendung zeichnen sich auch in prospektiven Studien ab, so z.B. eine signifikante Steigerung des Ein-Jahres-Überlebens bei Patienten mit schwerer PGD [45]. In Anbetracht eines zunehmenden und erfolgreichen ECLA-Einsatzes an wachen, spontan atmenden Patienten ist zudem eine Reduktion der präoperativen Abhängigkeit von mechanischer Beatmung möglich [46–49], welche einen Risikofaktor für das Überleben nach LTx darstellt [50]. Der technische Aufwand und das hohe Komplikationspotential lassen einen flächendeckenden Einsatz der ECLA-Verfahren außerhalb spezialisierter Zentren gegenwärtig jedoch nicht realistisch erscheinen.

Die größten Herausforderungen in der Entwicklung eines langfristig anwendbaren und sicheren Oxygenators ergeben sich aus der Tatsache, dass das Patientenblut in ständigem Kontakt mit synthetischem Material steht (Abbildung 2). Um einen suffizienten Gasaustausch zu gewährleisten, muss eine ausreichend große Oberfläche vorhanden sein, die für erwachsene Patienten bisher auch bei Verwendung der effektivsten bekannten HFMs mehr als einen Quadratmeter misst [29, 36]. Diese initiiert – wie jede künstliche Oberfläche – eine Ablagerung von Plasmaproteinen sowie eine Aktivierung proinflammatorischer und prokoagulatorischer Signalkaskaden mit konsekutiver Thrombusformation. Es kommt hierdurch zu einem fortschreitenden Verschluss des Blutkompartimentes im Oxygenator, was einen erhöhten Flusswiderstand, eine Reduktion der Gasaustauschkapazität und schließlich ein Versagen des gesamten Oxygenatorsystems nach sich zieht [51]. Eine koagulationshemmende Begleitmedikation ist daher unabdingbar. Trotz systemischer Heparinisierung der Patienten und Beschichtung der HFMs mit Albumin und Heparin lässt sich mittel- bis langfristig aber eine Thrombenbildung auf den Gasaustauschmembranen beobachten [29], sodass die maximale klinische Nutzungsdauer eines Membranoxygenators auf einige Wochen beschränkt ist [3]. In rund 10% der Fälle ist ein Wechsel des Oxygenators bereits binnen 14 Tagen notwendig [51]. Weitere häufige Komplikationen sind z.B. schwere Blutungsereignisse auf Grund der Antikoagulation [30]; darüber hinaus kann es zu hämolytischen Reaktionen und Sepsis kommen [29, 44]. Bei Anlage einer arteriellen Kanülierung, die im Regelfall über die Femoralgefäße erfolgt, ist zudem eine Ischämie der betroffenen Extremität möglich [36, 52].

Die zunehmende Erfahrung und die Fortschritte beim klinischen Einsatz der ECLA-Systeme sprechen dafür, das Funktionsprinzip der modernen Oxygenatoren als Ausgangs-

punkt für die weitere Entwicklung der Biohybridlunge zu nutzen – beispielsweise durch Verwendung eines Membrangerüstes aus polymeren Hohlfasern. Obwohl sich pumpenlose Systeme im Rahmen ihres limitierten Indikationsspektrums als komplikationsärmer bewährt haben und die Entwicklung von PMP-HFMs auch das Problem der Plasmaleckage weitgehend gelöst hat, ist ein Langzeiteinsatz nach wie vor jedoch nicht möglich [51]. Hierfür müssten primär die Thrombogenität und die proinflammatorischen Eigenschaften der künstlichen Oberflächen, insbesondere der Gasaustausch-HFMs, reduziert werden, was durch technische Mittel bisher noch nicht in ausreichendem Maße gelungen ist. Durch Endothelialisierung ist dagegen eine biologische Oberfläche vorstellbar, die bessere antithrombogene und antiinflammatorische Charakteristika aufweisen könnte. Möglicherweise könnte auf diesem Wege auch der Bedarf antikoagulatorischer Pharmaka gesenkt und so das Auftreten von Folgekomplikationen (z.B. Blutungen) reduziert werden.

2.2 Hämokompatibilität und Biologisierung artifizieller Oberflächen

Dass die Interaktion des Blutes mit synthetischen Materialien speziell durch die einsetzende Blutgerinnung problematisch ist, ist z.B. auch von Gefäßprothesen oder artifiziellen Herzklappen her bekannt und seit Jahren Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen [53–55]. Im Zentrum der Aufmerksamkeit steht dabei die Entwicklung einer biologisch kompatiblen Oberfläche, die möglichst viele der physiologischen Eigenschaften des Gefäßendothels teilt, denn besonders für den Langzeiteinsatz oder die Implantation eines Lungenunterstützungssystems stellt die Vermeidung thrombotischer Ereignisse eine zwingende Voraussetzung und somit einen zentralen Entwicklungsschritt dar.

2.2.1 Oberflächeninduzierte Blutgerinnung

Beim Kontakt von Bestandteilen des Blutes mit artifiziellen Oberflächen werden verschiedene Signalkaskaden initiiert, die auf komplexe Weise miteinander interagieren und am Ende zu inflammatorischen Prozessen und Thrombenbildung führen. Der Vergleich unterschiedlicher Polymere zeigt, dass es beim Kontakt mit Blut zeit- und materialabhängig zu einer raschen Adsorption von Proteinen kommt, z.B. von Fibrinogen und Fibronektin [56]. Abgesehen von Albumin, welches die Adhäsion von Blutzellen und die Thrombusformation zu reduzieren scheint [57], findet in Abhängigkeit von diesen Proteinen eine zunehmende Attraktion, Aktivierung und Aggregation von Thrombo- und Leukozyten statt, wobei die Thrombozytenaktivierung positiv mit der adsorbierten Menge proadhäsiver Proteine korreliert [57]. Dabei wird beispielsweise die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD-Sequenz), die in Matrixproteinen wie Fibronektin gehäuft vorkommt, vom thrombozytären Integrinkomplex Glykoprotein-IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) gebunden [41]. Insgesamt scheint diese prothrombotische Aktivierung von zellulären Bestandteilen des Blutes – vor



Abb. 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Gasaustausch-HFM mit Auflagerungen thrombotischen Materials (*) nach Blutkontakt. Originalabbildung zur Verfügung gestellt und Verwendung genehmigt von Dr. C. Hess.

allem von Thrombozyten – die treibende Kraft hinter der oberflächeninduzierten Thrombenbildung auf synthetischen Biomaterialien zu sein, während die Aktivität adsorbierter Enzyme der Koagulationskaskade eher gering einzustufen ist [56]. Neuere Forschungsergebnisse bestätigen diese Beobachtung [58]. Dennoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass gleichzeitig weitere, nicht-zelluläre Mechanismen beteiligt sind: Thrombozyten, Leukozyten, Komplementsystem, extrinsischer und intrinsischer Pfad der Koagulationskaskade sowie andere Bestandteile des Blutes sind keine isolierten Systeme, sondern interagieren auf vielfältige Weise miteiandender [4, 57]. Die dabei auftretende Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden lässt die materialassoziierten Gerinnungsprozesse auch als spezielle Form einer Entzündungsreaktion erscheinen, die unter anderem zu einem Verbrauch von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren führt [41]. Neben den künstlichen Oberflächen sind weitere Faktoren beteiligt, z.B. Scherkräfte, die über eine Lyse von Erythrozyten zur Freisetzung prothrombogen wirksamer Substanzen aus dem Zellinneren führen können [57]. Auch längere Perfusionszeiten oder niedrige Flussgeschwindigkeiten korrelieren mit dem Auftreten thrombotischer Ereignisse [59]. Im Endeffekt kommt es im Oxygenator zur Ausbildung fibröser Netzwerke mit darin eingeschlossenen Blutzellen [51], welche die Gasdiffusion entsprechend beeinträchtigen (Abbildung 3). Da synthetische Biomaterialien – anders als z.B. Endothelzellen – stets zu Proteinadsorption neigen, lässt sich die Aktivierung von Blutgerinnungsprozessen auf künstlichen Oberflächen ohne spezielle Modifikationen bzw. antithrombogene Medikation nicht vermeiden [57].

2.2.2 Ansätze zur Optimierung der Hämokompatibilität

Aus diesem Grund wird seit Jahren nach Möglichkeiten gesucht, die Bio- und insbesondere die Hämokompatibilität von blutkontaktierenden Implantaten zu verbessern. Besonders wünschenswert wäre dafür eine Oberfläche, welche über aktive antihrombogene Eigenschaften verfügt (ähnlich einer nicht aktivierten Endothelzelle, s.u.) oder sich zumindest passiv antithrombogen verhält. Die in Abschnitt 2.1.1 erwähnte Beschichtung mit Albumin und Heparin, die in modernen Membranoxygenatoren zum Einsatz kommt, stellt eine solche passive Modifikation dar und ist kein neues Verfahren: Schon vor mehr als zehn Jahren hat man versucht, synthetische Oberflächen durch Immobilisation von Albumin und Heparin hämokompatibler zu gestalten [60]. Obwohl dabei nur rund ein Viertel der ausschlaggebenden Antithrombin-III-Bindungsaktivität des Heparins erhalten bleibt, reduziert eine solche Modifikation signifikant die Aktivierung von Enzymen des Kontaktaktivierungssystems, wohingegen sich die Thrombozytenadhäsion auf diese Weise nicht senken lässt [60]. Eine konfluente Besiedlung der Biomaterialien mit humanen Endothelzellen wird deswegen als vielversprechendere Methode gesehen, um die physiologische Innenwand der Blutgefäße nachzubilden – einschließlich ihrer antithrombogenen und antiinflammatorischen Oberfläche. Erschwert wird eine solche Modifikation durch die Tatsache, dass es sich bei den als Substrat verwendeten Kunststoffen um ausgesprochen hydrophobe Polymere handelt, auf denen die Zellen nur schlecht adhärieren können [61]. Eine dem Besiedlungsprozess vorausgehende Beschichtung, z.B. mit Fibronektin, könnte jedoch geeignet sein, um hydrophobe Oberflächen zu maskieren und die Adhäsion, Proliferation und Funktion humaner Endothelzellen zu ermöglichen [61]. Generell scheint die Hydrophilizität eines Substrates positiv mit der endothelialen Adhäsion zu korrelieren [61, 62]. Zur Anheftung verfügen Endothelzellen über mindestens 13 unterschiedliche Integrine, die als Transmembranrezeptoren unter anderem an bestimmte Peptidmotive (wie die RGD-Sequenz im Fibronektin und weiteren Proteinen) binden können und eine feste Verankerung induzieren [62]. Ihre Spezifität erhalten diese heterodimeren Rezeptoren durch eine Variation ihrer α- und β-Untereinheiten, wobei die wenigsten Integrine spezifisch nur an bestimmte Liganden binden [62, 63]. Da auch eine Bindung an Heparin erfolgen kann, stellt die weniger thrombogene Albumin / Heparin-Beschichtung ebenfalls ein mögliches Substrat für die Kultivierung von Endothelzellen auf künstlichen Oberflächen dar [32, 64].

Oberflächentopographie und chemische Eigenschaften des verwendeten Biomaterials sowie Proteinadsorption und Beschichtung beeinflussen allerdings nicht nur die initiale Zelladhäsion, sondern auch das weitere Verhalten hinsichtlich Morphologie, zytoskelettaler Ausrichtung und Zellproliferation. So sind allein mit dem Integrinsystem sowohl das Aktin-Zytoskelett als auch unterschiedliche Signalkaskaden verknüpft; eine Beeinflussung des Expressionsprofils und damit auch des antithrombogenen, antiinflammatorischen Endothelzellphänotyps ist denkbar [63, 65]. Es scheint jedoch, dass die Endothelzellen ihre charakteristischen Eigenschaften nach Kultivierung auf unterschiedlichen Biomaterialien

beibehalten [32, 33, 58, 66, 67]. Dass die Besiedlung künstlicher Oberflächen mit endothelialen Zellen als geeigneter Ansatz zur Reduktion thrombotischer Ereignisse dienen kann, ist mittlerweile zudem durch funktionelle Untersuchungen gezeigt worden: Auf Kollagen, Titan und Albumin / Heparin-beschichteten Polymeren zeigt sich nach Endothelialisierung eine signifikant (teils bis über 500-fach) geringere Thrombozytenadhäsion im Vergleich mit unbesiedelten Kontrollmaterialien [32, 60, 68, 69].

2.3 Eignung von Zellen zur Oberflächenendothelialisierung

Die Grundlage dieser Entwicklungen auf dem Gebiet der antithrombogenen Oberflächenmodifikation ist die Etablierung einer konfluenten, endothelialen Zellschicht auf dem zu besiedelnden Biomaterial. Aus einer detaillierten Betrachtung des endothelialen Zellverbandes, seines Proliferationsverhaltens und vor allem der unterschiedlichen Aktivierungszustände endothelialer Zellen gehen sowohl das Potential eines solchen Lösungsansatzes als auch die Hindernisse, die einer praktischen Anwendung bisher im Wege gestanden haben, hervor.

2.3.1 Der endotheliale Phänotyp

Das Endothel ist mesodermalen Ursprungs und entsteht durch Vaskulogenese (*in situ* - Differenzierung von Kapillaren während der Embryonalperiode) und Angiogenese (Aussprossung aus bestehenden Gefäßen) [70]. Es stellt die physiologische Innenauskleidung sämtlicher Blutgefäße dar und ist an unterschiedlichen Stoffwechselvorgängen zentral beteiligt, wobei die Zellen des pulmonalen Kreislaufs ca. 30% des gesamten Gefäßendothels des Körpers ausmachen [71]. Eine Endothelzelle misst ca. $30 \times 12 \times 0{,}3$ µm [72]. Weil das Endothel im nicht aktivierten Zustand sowohl die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten als auch die plasmatische Blutgerinnung inhibiert, stellt es gegenwärtig die beste vorstellbare Beschichtung zur Maskierung synthetischer Oberflächen mit Blutkontakt dar. Es ist dabei als eine dynamische Grenzfläche zu sehen, welche den Blutfluss nicht nur passiv aufrecht erhält, sondern insbesondere der plasmatischen Blutgerinnung auch durch aktive Mechanismen entgegen wirkt [58, 73]. Durch Einwirkung bestimmter Stimuli kann dieser antithrombogene jedoch in einen prothrombogenen Phänotyp übergehen (siehe Abschnitt 2.3.3). Bestimmte Marker, die charakteristisch für endotheliale Zellen sind, werden *in vitro* nahezu unabhängig vom Aktivierungszustand exprimiert; besonders spezifisch sind die Rezeptoren des *vascular endothelial growth factor* (VEGF), VEGFR1 (auch bekannt als *fms-like tyrosine kinase - 1* (flt-1) oder *fms-related tyrosine kinase* (frt)) und VEGFR2 (auch bekannt als *fetale liver kinase - 1* (flk-1), *kinase-insert domain receptor* (KDR) oder CD 309), sowie das Adhäsionsprotein Cadherin - 5 (*vascular endothelial cadherin* (VEcad), auch bekannt als CD 144) [74]. Weiterhin werden auch das *angiotensin converting enzyme*

(ACE, auch CD 143), der von Willebrand - Faktor (vWF), CD 31 (auch *platelet endothelial cellular adhesion molecule - 1* (PECAM-1)), Endoglin (CD 105), CD 34, E-Selektin (*endothelial leukocyte adhesion molecule - 1* (ELAM-1), auch CD 62E), P-Selektin (CD 62P) sowie die Angiopoetin-Rezeptoren *tyrosine kinase with immunglobulin- and EGF-like domains - 1* (tie-1) und *tunica endothelial kinase* (tek, auch tie-2 oder CD 202) häufig zur Identifikation von Endothelzellen verwendet [74]. Diese Marker sind allerdings weniger spezifisch und in ihrer Expression teils vom zellulären Aktivierungszustand abhängig, insbesondere die Selektine [72, 74, 75]. Da *in vivo* weitere Faktoren, z.B. Scherkräfte oder Sauerstoffversorgung, das lokale Mikromilieu kennzeichnen, entsteht aus der Summe aller Einflüsse das definitive Differenzierungsmuster einer Endothelzelle, welches auf Grund seiner Variabilität und Reversibilität unter *in vitro* - Bedingungen nur teilweise erhalten werden kann [70, 74]. Eine ergänzende Charakterisierung kann deshalb durch funktionelle Untersuchungen erfolgen, z.B. durch Aufnahme von acetyliertem *low density lipoprotein* (acLDL), Bindung des Lektins *Ulex europaeus agglutinin - 1* (UEA-1) oder Ausbildung kapillarähnlicher Röhren auf bestimmten Substraten (Matrigel) [76].

Die vollständige Besiedlung eines Membranoxygenators mit derartigen Zellen könnte auf zwei Arten erfolgen: Einerseits könnte es mit einer ausreichend großen Zahl endothelialer Zellen möglich sein, alle synthetischen Oberflächen bereits initial mit einer konfluenten Endothelzellschicht zu maskieren. Alternativ erscheint die längerfristige Kultivierung proliferationsfähiger endothelialer Zellen direkt auf den Biomaterialien des Oxygenators möglich, wodurch sich dann ebenfalls ein geschlossener Zellverband ausbilden könnte. Da die quantitative Verfügbarkeit autologer Gefäßwand-Endothelzellen aber begrenzt ist, wäre in beiden Fällen eine Phase der *in vitro* - Expansion der isolierten Zellen unabdingbar. Dies gestaltet sich problematisch, weil aus Gefäßwänden gewonnene Endothelzellen in Kultur schnell seneszent werden, ihre Proliferation einstellen und auch funktionelle Veränderungen durchlaufen [77–79]. Neben der invasiven Isolationsprozedur, beispielsweise aus einer entnommenen Beinvene [80], schränken insbesondere diese Charakteristika die Eignung von Gefäßwand-Endothelzellen zur Besiedlung größerer Oberflächen ein. Zum Einsatz in einer Biohybridlunge wird dagegen ein Zelltyp benötigt, der über ein ausreichend großes Proliferationspotential verfügt und dabei einen endothelialen Phänotyp aufweist, der trotz langfristiger Kultivierung auf den synthetischen Materialien stabil bleibt.

2.3.2 Endotheliale Progenitorzellen

Einen der gegenwärtig vielversprechendsten Lösungsansätze stellen sog. endotheliale Progenitorzellen (*endothelial progenitor cells*, EPCs) dar, die seit ihrer Erstbeschreibung im Jahr 1997 [81] Gegenstand zahlreicher Untersuchungen sind. Die erste Isolation ist aus flk-1/CD 34 - coexprimierenden, mononukleären Zellen des peripheren Blutes erfolgt, die *in vitro* sowohl typische Marker (z.B. CD 31, tie-2, ELAM-1) als auch ausgewählte Ei-

genschaften (z.B. Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem acLDL, Bindung von UEA-1) des Gefäßendothels aufweisen [81]. Als Ursprung der entdeckten Progenitoren gilt das Knochenmark [75]. Bei Folgeuntersuchungen ist zumeist die Expression bestimmter Muster von Oberflächenantigenen genutzt worden, um Zellisolate als vermeintliche EPCs zu identifizieren. Da jedoch phänotypische und funktionelle Überschneidungen zwischen reifen Endothelzellen, EPCs und hämatopoetischen Stammzellen existieren [82], sind der Terminus „EPC“ und ähnliche Begriffe über Jahre hinweg für verschiedene Zellarten verwendet worden, die man durch unterschiedliche Isolationsprotokolle gewonnen hat und die teilweise nicht endothelialer Abstammung sind, sondern der hämatopoetischen Reihe entstammen und vermutlich einen myeloischen bzw. monozytären Ursprung haben [83]. Nach wie vor ist es nicht gelungen, ein exklusives EPC-Antigen zu identifizieren, sodass EPCs als unreife endotheliale Zellen definiert worden sind, welche die Stressresistenz und klonale Expansionsfähigkeit von Stammzellen sowie die Fähigkeit zur Differenzierung in reife Endothelzellen besitzen [75, 76]. Obwohl auch einige funktionelle Assays, vor allem die Bindung bzw. Aufnahme von UEA-1 oder acLDL, nicht spezifisch sind, stellen derartige Funktionsuntersuchungen die wichtigsten Methoden zur Unterscheidung „falscher“ EPCs (Zellen hämatopoetischer Herkunft mit endothelialen Charakteristika) und „echter“ EPCs dar. Die Ausprägung tubulärer Strukturen auf Matrigel *in vitro* sowie der Einbau allo- oder xenogener Zellen an Orten aktiver Angiogenese im Tierversuch sind dabei als exklusive Merkmale „echter“ EPCs von besonderer Relevanz [84].

Ein wesentlicher Unterschied besteht zudem in der Zeit, die das Auswachsen der Zellen aus den Primärisolaten beansprucht, weshalb einige Autoren eine Differenzierung zwischen sog. frühen und späten *outgrowth endothelial cells* (OECs) vorgenommen haben: Die frühen OECs imponieren in Kultur binnen weniger als einer Woche als scheinbar endotheliale Zellen und entsprechen „falschen“ EPCs – diese Zellen exprimieren neben einigen endothelialen Antigenen auch typische Marker hämatopoetischer Zellen (z.B. CD 14 und CD 45), vermehren sich nur begrenzt und verfügen nicht über alle funktionellen Charakteristika reifer Endothelien [76, 83]. Demgegenüber handelt es sich bei den späten OECs, die frühestens eine Woche nach Aussaat der mononukleären Zellfraktion aus Nabelschnurblut oder peripherem Blut erkennbar sind, um „echte“ EPCs. Dieser Zelltyp ist erstmals im Jahr 2004 isoliert und von seinem Erstbeschreiber als endotheliale koloniebildende Zelle (*endothelial colony-forming cell*, ECFC) bezeichnet worden [85]. Diese Zellen verfügen über eine hohe Telomerase-Aktivität und stechen durch ihr außerordentliches Proliferationspotential hervor; mehr als 100 Populationsverdopplungen (*population doublings*, PDs) ohne Anzeichen von Seneszenz sind beobachtet worden [85]. Während auch der Ursprung dieser Zellen zeitweise im Knochenmark vermutet worden ist [76], deuten neuere Erkenntnisse darauf hin, dass die im peripheren Blut seltenen ECFCs aus den Gefäßwänden stammen könnten [82, 86]. Neben ihrer charakteristischen Proliferationskapazität weisen ECFCs zahlreiche endotheliale Marker und Eigenschaften bei Abwesenheit von CD 14 und CD 45 auf [85]. Gleiches gilt für den Stammzellmarker CD 133 (auch als AC 133 oder Promi-

nin-1 bekannt), der auf reifen Gefäßwand-Endothelzellen wie ECFCs gleichermaßen fehlt [87, 88]. Des Weiteren sind humane ECFCs in der Lage, in immundefizienten Mäusen chimäre Gefäße auszubilden; eine klonale Verwandtschaft mit frühen OECs besteht dagegen nicht [89]. Da die Suche nach einem einzigartigen ECFC-Antigen bisher erfolglos geblieben ist [86], kann eine definitive Identifikation von ECFCs derzeit nur durch die gleichzeitige Betrachtung von Wachstumsverhalten, Phänotyp und funktionellen Eigenschaften erfolgen; eine Übersicht gibt Tabelle 2. Es handelt sich dabei jedoch um eine rein experimentelle Definition, *in vivo* ist der Status einer zirkulierenden EPC immer noch putativ [82]. Ein endgültiger – gerade auch terminologischer – Konsens besteht nicht. Um mit der definitorischen Unschärfe des „EPC"-Begriffes aufzuräumen, ist schon mehrfach gefordert worden, diesen Terminus entweder auf ECFCs zu beschränken [83] oder ihn zugunsten einer präziseren Nomenklatur ganz aufzugeben [84].

Weil ECFCs den Gefäßwand-Endothelzellen morphologisch, phänotypisch und funktionell außerordentlich ähnlich sind, gleichzeitig aber über eine mit Stammzellen vergleichbare Proliferationsaktivität verfügen, scheinen sie der ideale Zelltyp für biologisches *tissue engineering* oder die Endothelialisierung synthetischer Biomaterialien zu sein. Vor diesem Hintergrund ist die langfristige Kultur und Expansion dieser Zellen bereits untersucht worden. Dabei hat sich gezeigt, dass ECFCs aus dem peripheren Blut Erwachsener (*human adult peripheral blood-derived endothelial colony-forming cells*, hAPB-ECFCs) über mehrere Monate passagiert und expandiert werden können, ohne ihren Phänotyp oder typische

	frühe OECs („falsche" EPCs)	**ECFCs / späte OECs („echte" EPCs)**
Auftreten in Kultur:	ab 4. Tag	frühestens nach 7 Tagen
Morphologie:	rund bis spindelförmig, keine Konfluenz	polygonal, pflastersteinartig, konfluente Einzelzellschicht
Proliferationsrate:	gering	sehr hoch
Endothelzell-Marker:	einige (z.B. CD 31, CD 34)	typischer Phänotyp (z.B. flt-1, flk-1, VEcad, vWF, CD 31, CD 34, CD 105)
Hämatopoese-Marker:	CD 14, CD 45, CD 133	keine
Lektinbindung:	Bindung von UEA-1	Bindung von UEA-1
LDL-Aufnahme:	Aufnahme von acLDL	Aufnahme von acLDL
Verhalten *in vitro*:	keine Ausbildung kapillärer Röhren	Ausbildung kapillarähnlicher Röhren
Verhalten *in vivo*:	Verbesserung der Neovaskularisation (vermutlich parakrin)	Verbesserung der Neovaskularisation sowie Einbau in Gefäßwände
Ursprung:	hämatopoetische Zellen ($CD45^+$) des Knochenmarks	$CD45^-$ $CD133^-$ $CD34^+$ Zellen des Knochenmarks und/oder der Gefäßwände

Tab. 2: Charakteristika humaner EPCs nach [82], ergänzt um Angaben aus [32, 84–86].

funktionelle Eigenschaften zu verlieren, d.h. zu dedifferenzieren [90]. Gleiches gilt für aus Nabelschnurblut isolierte ECFCs (*human cord blood - derived endothelial colony - forming cells*, hCB-ECFCs): Durch serielle Passagierung über 60 – 70 Tage ist eine einzelne ECFC-Kolonie in der Lage, eine Zellmasse von bis zu 10^{11} ECFCs zu generieren – ebenfalls ohne Verlust des stabilen Karyotyps oder des endothelialen Phänotyps [91]. Theoretisch sind sogar noch höhere Zellzahlen denkbar [91]. Auch unter Xenoprotein-freien, humanisierten Kulturbedingungen ist eine stabile Expansion von sowohl hAPB- als auch hCB-ECFCs über mehr als 30 PDs gelungen [92], was einen weiteren Schritt zur Nutzbarmachung dieses Zelltyps für therapeutische Zwecke darstellt. Erste Versuche zur Endothelialisierung von Biomaterialien mit hAPB-ECFCs zeigen eine intakte Einzelzellschicht mit endothelialem Phänotyp und erhaltener Aktivierungsfähigkeit [93].

Ein weiterer Vorteil dieses Zelltyps ist die einfache, wenig invasive Gewinnung von peripherven̈osem Blut bzw. Nabelschnurblut zu Isolationszwecken. Bereits vor der ersten Beschreibung der ECFCs ist im direkten Vergleich beobachtet worden, dass aus Nabelschnurblut deutlich größere Zahlen von Progenitorzellen mit endothelialen Charakteristika generiert werden können als aus dem peripherem Blut Erwachsener [87, 94]. Dies trifft auch auf die ECFC-Subpopulationen zu; zudem verfügen hCB-ECFCs über ein signifikant – rund 100× – größeres Proliferationspotential als hAPB-ECFCs, welches sich unter anderem durch ihre längeren Telomere sowie die stärkere Telomerase-Aktivität in hCB-ECFCs erklären lässt [84, 85, 92]. Besonders hoch ist die ECFC-Konzentration im Nabelschnurblut reifer, d.h. um den errechneten Geburtstermin geborener Kinder [95]. Vor allem in der experimentellen Forschung sind hCB-ECFCs für Fragestellungen mit hohem Zellbedarf der endotheliale Zelltyp der Wahl: Nabelschnurblut bietet eine leicht verfügbare und sehr zuverlässige ECFC-Quelle, die Zellen können in großem Maßstab *in vitro* expandiert werden und sie unterscheiden sich – von ihrem höheren Proliferationspotential abgesehen – scheinbar nicht von nativen Gefäßwand-Endothelzellen [91, 96]. Diese Kombination wünschenswerter Eigenschaften korrespondiert auch mit den Ergebnissen vorausgehender Versuche, während derer eine Kultivierung der hCB-ECFCs ohne Verlust des Phänotyps oder Anzeichen von Seneszenz für mehr als drei Monate möglich gewesen ist [32]. Daran anknüpfend sind auch in dieser Arbeit hCB-ECFCs zur Endothelialisierung der polymeren HFMs verwendet worden.

2.3.3 Aktivierungszustand und Funktionalität

Die Begriffe „Aktivierungszustand“ und „Aktivierungsfähigkeit“ beschreiben die typische Eigenschaft endothelialer Zellen (einschließlich EPCs bzw. ECFCs), ihre Proteinexpression und damit mehrere zelluläre Funktionen abhängig von bestimmten Umgebungsfaktoren und dem lokalen Milieu zu verändern [72]. Vor diesem Hintergrund stellt eine fehlende Aktivierung bei erhaltener Aktivierungsfähigkeit den physiologischen Ruhezustand dar:

Oberflächenproteine wie Thrombomodulin (TM) sowie negativ geladene Glykosaminoglykane, z.B. Heparansulfat, bedingen die antithrombogenen und antiinflammatorischen Eigenschaften, die für gesunde Endothelzellverbände charakteristisch sind [73, 97]. Durch derartige Moleküle wird das nicht aktivierte Endothel *in vivo* zum hauptsächlichen Ort der Thrombin-Inaktivierung sowie der Plasminogen- und Antithrombin-III-Aktivierung. Weitere Produkte des endothelialen Metabolismus, z.B. Prostaglandin I_2 (Prostacyclin) und Stickstoffmonoxid (NO), hemmen zusätzlich die Thrombozytenaggregation [41, 73, 97].

Eine Aktivierung der endothelialen Zellen kann von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. bakteriellem Lipopolysaccharid oder Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), Zellschäden, Hypoxie und anderen Veränderungen des lokalen Milieus hervorgerufen werden [73, 98]. Dabei wird die mRNA-Transkription bestimmter Gene durch unterschiedliche Signalkaskaden moduliert (sog. *Up-* bzw. *Down-Regulation*), was eine Veränderung der Proteinexpression und Enzymaktivität nach sich zieht und zu einem Verlust der antiinflammatorischen, antithrombogenen Eigenschaften zugunsten eines proinflammatorischen, prothrombogenen Phänotyps führt [97]. Die vermehrte Expression von Chemokinen, Selektinen und weiteren Zelladhäsionsmolekülen (*cellular adhesion molecules*, CAMs) vom Typ der Integrinliganden durch endotheliale Zellen [72] erfolgt abhängig von der Dosis der auslösenden Zytokine [99] und wird meist durch den Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells* (NFκB) vermittelt [98]. Sie ist auch eine Voraussetzung für die leukozytäre Transmigration in den extravasalen Raum im Rahmen der Entzündungsreaktion [100]. Die vermehrte Expression von Gewebsthromboplastin (*tissue factor*, TF) bei Endothelzellaktivierung [101] erfolgt ebenfalls NFκB-abhängig [98]. TF ist auf der Oberfläche nicht aktivierter Endothelien nur rudimentär vorhanden und stellt als Ausgangspunkt des extrinsischen Pfades der Gerinnungskaskade den wichtigsten Initiator der plasmatischen Blutgerinnung dar, verstärkt durch einen synchronen Rückgang der Expression von TM [97]. Schließlich unterstützen aktivierte endotheliale Zellen auch die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten, unter anderem durch gesteigerte Expression und Freisetzung von plättchenaktivierendem Faktor (*platelet activating factor*, PAF) und vWF [73, 97].

Für die Entwicklung einer Biohybridlunge ist es notwendig, dass die zur Oberflächenendothelialisierung eingesetzten Zellen weder durch den Kontakt mit dem als Substrat verwendeten Biomaterial noch durch die Besiedlungsprozedur selbst ihren nicht aktivierten Phänotyp ablegen (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.2). Neben dem Substrat müssen hierbei unterschiedliche Umgebungsfaktoren berücksichtigt werden; eine hohe Relevanz kommt insbesondere dem auf die Zellen einwirkenden Scherstress zu.

2.3.4 Scherstressabhängige Modifikation des Expressionsprofils

Der Scherstress im Blutkreislauf resultiert aus den Reibungsprozessen zwischen Gefäßwand und Blutstrom und ist definiert als die Kraft, welche in Flussrichtung auf die Oberfläche einer Gefäßwand einwirkt [102]. Er wird meist in dyn/cm^2 angegeben (wobei 1 dyn einer Kraft von 10^{-5} Newton entspricht) und ist unter anderem von der Fließgeschwindigkeit des Blutes abhängig. Legt man das Gesetz von Hagen-Poiseuille zugrunde, besteht eine direkte proportionale Beziehung zwischen Scherstress und Blutfluss [103]. Unter physiologischen Bedingungen entstehen dabei in den meisten Abschnitten des Blutkreislaufs etwa 5 – 20 dyn/cm^2 [71], während andere Autoren teilweise höhere Werte von bis zu 50 dyn/cm^2 und mehr postulieren [103, 104]. Derartig hoher Scherstress tritt allerdings nur in den Arteriolen und Kapillaren des großen Kreislaufs auf, während z.B. in den größeren Arterien und im venösen System physiologisch selten Werte über 15 dyn/cm^2 entstehen [103]. Der einwirkende Scherstress ist – neben der extrazellulären Matrix – ein zentrales Charakteristikum der lokalen Nische, welche das definitive Expressionsprofil einer endothelialen Zelle festlegt. Durch den Vergleich von Endothelzellen aus unterschiedlichen Arealen des Gefäßsystems und *in vitro* - Expositionsassays ist es gelungen, einige Proteine zu identifizieren, deren Expression besonders spezifisch mit dem auftretenden Scherstress korreliert: Endothelin - 1 (ET-1), ein potenter Vasokonstriktor, zeigt nach einstündiger Exposition gegenüber physiologischem Scherstress eine signifikant verminderte Expression [105, 106]. Demgegenüber lässt sich bei hoher Scherbelastung eine signifikante Induktion der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und des *Krüppel-like factor - 2* (KLF-2) beobachten [106, 107]. Die vermehrte NO-Produktion bei Anstieg des Scherstresses führt zu einer Vasodilatation und dient als zentraler Mechanismus in der Autoregulation des Blutflusses durch das Gefäßendothel [108].

Unter diesen drei Markern gilt KLF-2 (auch bekannt als *lung KLF*, LKLF), ein Transkriptionsfaktor vom Zinkfinger-Typ [109], als spezifischster Marker für Scherstress, da er in endothelialen Zellen ausschließlich durch die bei Flussexposition auftretenden Scherkräfte induziert wird [110]. Nachfolgend hat sich KLF-2 als zentraler transkriptioneller „Schalter“ zwischen nicht aktiviertem und aktiviertem Phänotyp herausgestellt, der unter anderem über eine konsekutive Induktion von TM und eNOS die antithrombogenen Eigenschaften des nicht aktivierten Endothels vermittelt [58, 111]. Obwohl proinflammatorische Mediatoren wie TNF-α die Expression von KLF-2 reprimieren [110, 112], kann deren Wirkung dennoch abgedämpft werden – durch Flussexposition oder virale Überexpression von KLF-2 ist es sogar möglich, die zytokinabhängige Aktivierung endothelialer Zellen weitgehend zu unterdrücken [111, 113]. Dieser Mechanismus lässt sich durch eine kompetitive Bindung von KLF-2 (antiinflammatorisch) und NFκB (proinflammatorisch) am selben Transkriptions-Coaktivator erklären [112]. Auch das scherstressbedingte Remodeling des Aktin-Zytoskelettes mit nachfolgenden Veränderungen in Zellmorphologie und -ausrichtung wird abhängig von KLF-2 vermittelt [111, 114]. Insgesamt wirken die

meisten Formen von Scherstress auf Grund einer gesteigerten Expression des KLF-2 vasoprotektiv. Durch Aktivierung antioxidativer, antiadhäsiver und antithrombogener Gene werden einerseits das Endothel und die tieferen Schichten der Gefäßwand geschützt, andererseits atherosklerotische und thrombotische Prozesse inhibiert [107, 115]. Es sind allerdings nicht alle Formen von Scherstress geeignet, um einen derartigen Effekt hervorzurufen: Während ein pulsatiler im Vergleich mit einem laminaren Fluss noch stärker protektiv wirkt, sinkt die Expression von KLF-2 an Gefäßverzweigungen und bei Störungen des Flüssigkeitsstroms stark ab [110, 116]. Bei Auftreten von Turbulenzen kann dies bis hin zu einer Aktivierung der exponierten Zellen führen [41], was sich auch mit der NFκB-Aktivität von Endothelzellen überschneidet – diese ist umso höher, je geringer der einwirkende Scherstress ausfällt [117].

Die scherstressabhängige Modifikation des definitiven Phänotyps endothelialer Zellen, insbesondere der zusätzliche antithrombogene und antiinflammatorische Effekt durch Induktion von KLF-2, entspricht zwar eher der *in vivo* - Situation, ist jedoch reversibel und verschwindet unter statischen *in vitro* - Bedingungen binnen 72 Stunden [118]. Durch Reexposition z.B. gegenüber einem laminar strömenden Kulturmedium kann dieser Effekt wiederhergestellt werden [110]. Daraus folgt, dass der Oxygenator einer endothelialisierten Biohybridlunge über möglichst günstige Strömungseigenschaften verfügen, d.h. unter anderem die zelluläre Expression von KLF-2 fördern sollte. Mittlerweile liegen zudem erste Studien zum Verhalten von hCB-ECFCs unter Flussbedingungen vor, die bei diesem Zelltyp eine sehr gute Kurzzeitadhäsion unter Scherkräften von bis zu 285 dyn/cm^2 feststellen [119]. Dabei scheinen hCB-ECFCs sensibler für Scherstress zu sein als Gefäßwand-Endothelzellen aus der menschlichen Aorta: Während die hCB-ECFCs bei geringem Scherstress vermehrt prothrombotische Marker exprimieren, imponieren sie bei hohem Scherstress durch eine noch ausgeprägtere Induktion antithrombogener Faktoren [119]. Dies unterstreicht die Relevanz des Medium- bzw. Blutflusses zusätzlich.

2.4 Design bioartifizieller Lungenunterstützungssysteme

In Anbetracht der Anforderungen, die der Einsatz am Patienten an ein langfristig verwendbares Lungenunterstützungssystem stellt, ist das Gesamtprojekt „Biohybridlunge“ als eine Synthese der bisher dargestellten Zusammenhänge zu betrachten. Es kann nur durch Berücksichtigung aller erwähnten Faktoren realisiert werden: Zunächst wird eine Gasaustauschoberfläche benötigt, die einerseits eine effektive Diffusion der Atemgase erlaubt, andererseits die Leckage von Plasma auch langfristig verhindert [38]. Ferner sind ein Blutkompartiment, welches sich durch geringen Flusswiderstand und homogene Perfundierbarkeit auszeichnet, sowie eine flussstabile, antithrombogene und antiinflammatorische Oberflächenmodifikation notwendig [38]. Die größten Herausforderungen liegen dabei in der Hämokompatibilität der blutkontaktierenden Materialien – um diesen gerecht zu wer-

den, muss das fertige Lungenunterstützungssystem die Aktivierung proinflammatorischer und prothrombogener Signalkaskaden sowie die Traumatisierung von Blutzellen minimieren [4]. Obwohl ein modernes Oxygenatorsystem wie z.B. das iLA-Modell nicht alle der genannten Anforderungen erfüllen kann (siehe Abschnitt 2.1), stellt es einen gut geeigneten Ausgangspunkt zur weiteren Entwicklung der Biohybridlunge dar. Um das Problem der oberflächeninduzierten Blutgerinnung zu lösen, existieren bisher zwar einige Ansätze, bisher ist aber keiner davon für den Langzeiteinsatz in einer künstlichen Lunge bzw. einem Oxygenator geeignet (siehe Abschnitt 2.2). Erfolgversprechend scheint eine Besiedlung der künstlichen Oberflächen mit endothelialen Zellen; insbesondere ECFCs könnten dafür auf Grund ihres Proliferationsverhaltens gut geeignet sein (siehe Abschnitt 2.3.1 und 2.3.2). Da der antithrombogene, antiinflammatorische Phänotyp dieser Zellen von zahlreichen Faktoren beeinflusst werden kann (siehe Abschnitt 2.3.3 und 2.3.4), ist es allerdings nötig, ihren Aktivierungsstatus in Abhängigkeit von den Umgebungsfaktoren genau zu untersuchen.

Um möglichst viele der Komplikationen zu vermeiden, welche sich aus der Verwendung technischer bzw. synthetischer Bauteile ergeben, arbeiten einige Forschungsgruppen mit Konstrukten, die auf einer vollständigen Dezellularisierung von Lungengewebe unter Aufrechterhaltung der physiologischen Gewebearchitektur beruhen [120]. Auf diesem Wege kann die extrazelluläre Matrix einer Lunge als rein biologisches Gerüst für dreidimensionales *tissue engineering* nutzbar gemacht und in einem nachfolgenden Schritt z.B. mit ECFCs und Alveolarepithelien besiedelt werden. Erste Tierversuche zeigen, dass solchermaßen de- und rezellularisierte Rattenlungen nach orthotoper Transplantation für bis zu sechs Stunden am Gasaustausch beteiligt sind; ihre Funktionsfähigkeit wird aber unter anderem durch Einblutungen in die Atemwege massiv gestört [121, 122]. Durch biomimetische Kultivierung vor Transplantation lässt sich die *in vivo* - Lebensdauer der biologischen Lungenkonstrukte auf bis zu sieben Tage ausweiten [123], doch ein Einsatz über Monate oder eine Übertragung der im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen erscheint auf absehbare Zeit nicht realistisch.

Demgegenüber wird mit der Biohybridlunge ein anderer, nämlich hybrider Ansatz verfolgt, der sich einer bereits für den klinischen Gebrauch etablierten Technik bedient und diese durch eine biologische Komponente – die Endothelialisierung – weiterentwickelt. Wie zuvor erläutert stellt eine Verbesserung der Hämokompatibilität zunächst den entscheidenden Schritt dar, um die Applikationsdauer eines Oxygenatorsystems verlängern zu können. Dieses Ziel wird durch eine Nachbildung der physiologischen Gefäßinnenwand auf den Außenflächen der Gasaustausch-HFMs angestrebt: Eine Besiedlung der polymeren Oberflächen mit endothelialen Zellen soll thrombotischen und inflammatorischen Ereignissen entgegen wirken, sodass das Blut auch über längere Zeiträume ohne Einschränkungen durch den Oxygenator fließen kann (Abbildung 4). Die ersten dokumentierten Versuche zur Kultivierung endothelialer Zellen auf PMP liegen zwar schon mehr als 30 Jahre zurück, doch

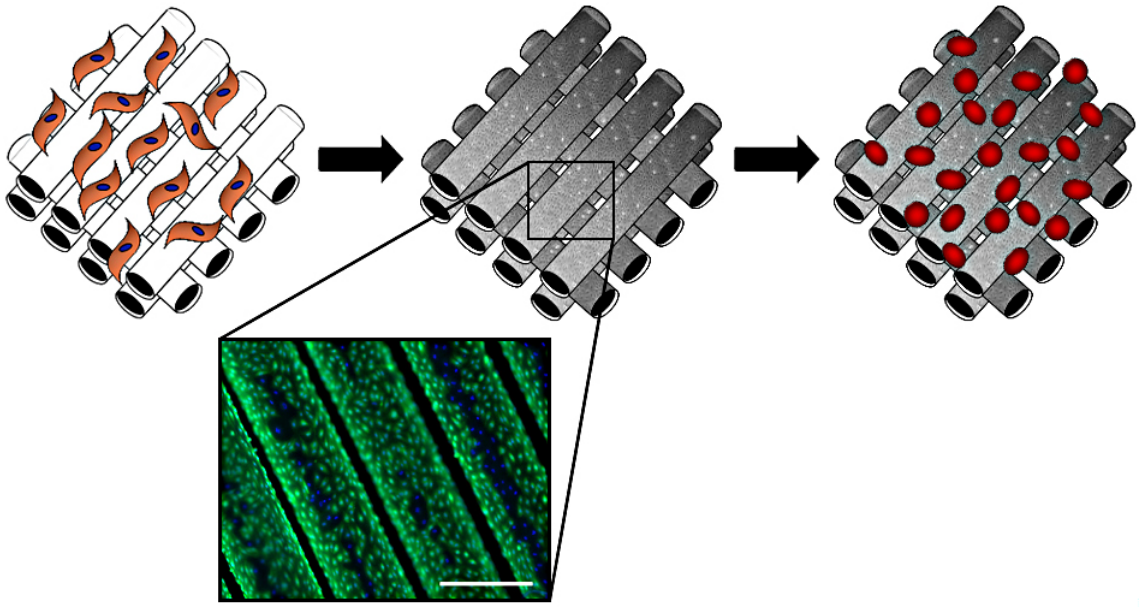


Abb. 4: Der biohybride Lösungsansatz – schematische Darstellung der Endothelialisierung polymerer Gasaustausch-HFMs. Durch eine Besiedlung der HFMs mit endothelialen Zellen wird ein direkter Kontakt des Blutes mit den synthetischen Oberflächen verhindert. Skalierung im vergrößerten Bildausschnitt: 500 µm. Teile der Abbildung zur Verfügung gestellt und Verwendung genehmigt von Dr. C. Hess.

obgleich das Polymer als Substrat für bovine Endothelien gut geeignet zu sein scheint [124], sind lange Zeit keine weiteren Veröffentlichungen zu diesem Thema erfolgt. Auch über die Endothelialisierung von Gasaustausch-HFMs existiert nur sehr wenig Literatur; darüber hinaus sind fast alle zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Daten an bovinem Aortenendothel generiert worden. Es hat sich gezeigt, dass die bovinen Gefäßwand-Endothelzellen sowohl an PP-HFMs als auch an Bündeln von PMP-HFMs adhärieren können, sofern die HFMs vor dem Besiedlungsprozess mit Fibronektin beschichtet werden [125, 126] – welches im Gegensatz zur Albumin / Heparin-Beschichtung der iLA-Oxygenatormembranen jedoch stark prothrombogen wirkt [41]. Eine Reproduktion dieser Experimente mit humanen Zellen ist zunächst nicht erfolgt. Außerdem sind in den zitierten Veröffentlichungen weder die längerfristige Kultur der Zellen auf den polymeren HFMs noch die zellulären Reaktionen auf Substrat und Endothelialisierungsprozess hinreichend untersucht worden, insbesondere nicht im Hinblick auf eine mögliche Voraktivierung. Ein alternativer Ansatz schlägt Mikrokanäle aus Silikon als Grundgerüst einer Biohybridlunge vor und weist nach, dass auch humane Gefäßwand-Endothelzellen auf Fibronektin-beschichteten Polymeren kultiviert werden können [127], blendet aber unter anderem die Expandierbarkeit dieses Zelltyps und damit die Eignung zur Endothelialisierung ausreichend großer Gasaustauschoberflächen aus.

Durch Verwendung moderner Typen von HFMs (inklusive PMP-HFMs) als Gerüststruktur, Verzicht auf eine *per se* prothrombogene Beschichtung wie Fibronektin sowie Besied-

lung der Membranen mit ECFCs, welche auch als autologe Zellquelle potentiell geeignet sein könnten, sollen – basierend auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft – möglichst optimale Ausgangsbedingungen für die Entwicklung einer HFM-basierten Biohybridlunge geschaffen werden. In einer dieser Arbeit vorausgehenden Veröffentlichung hat die Arbeitsgruppe Biohybridlunge die Isolation und Expansion von hCB-ECFCs beschrieben und die Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ausführlich charakterisiert [32]. Weiterhin ist im Rahmen einer zweidimensionalen Machbarkeitsstudie gezeigt worden, dass die hCB-ECFCs auf Folien aus Albumin / Heparin-beschichtetem PMP adhärieren können und eine vitale Einzelzellschicht ausbilden [32]. Dabei haben die Zellen ihren endothelialen Phänotyp und ihre Aktiverbarkeit durch proinflammatorische Stimuli aufrechterhalten. Die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten lässt sich durch Endothelialisierung signifikant reduzieren [32], selbst bei lediglich subkonfluenter Besiedlung der synthetischen Oberflächen [126]. In ersten Machbarkeitsstudien am dreidimensionalen Modell ist es auch gelungen, die hCB-ECFCs auf der Oberfläche polymerer Gasaustausch-HFMs zu kultivieren [33]. Ferner konnte durch eine andere Arbeitsgruppe im Tierversuch gezeigt werden, dass die Perfusion eines auf Gasaustausch-HFMs basierenden Lungenunterstützungssystems allein durch den rechten Ventrikel grundsätzlich möglich ist [128]. Da auch die Diffusion von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid über Albumin / Heparin-beschichtete Polymerfolien durch die Endothelialisierung nicht signifikant reduziert wird [32], erscheint das theoretische Konzept hinter diesem Ansatz zur Entwicklung einer Biohybridlunge insgesamt realisierbar.

2.4.1 Zentrale Fragen und Vorgehensweise dieser Arbeit

In direkter Anknüpfung an die vorausgehenden Versuche am zweidimensionalen und dreidimensionalen Modell [32, 33] soll die Endothelialisierung der polymeren Gasaustausch-HFMs in der vorliegenden Dissertation weiterentwickelt werden. Die zentrale Fragestellung liegt im ersten Teil dieser Arbeit in einer Optimierung der HFM-Besiedlung sowie in einer weiterführenden Charakterisierung der auf der Membranoberfläche etablierten Einzelzellschicht. Auf diesem Wege soll eine Kombination aus HFM-Typ und Kulturprotokoll identifiziert werden, deren Endothelialisierungsergebnis im Hinblick auf anschließende Experimente sowie einen potentiellen *in vivo* - Einsatz möglichst geeignete Bedingungen aufweist. Initial wird die Expression charakteristischer endothelialer Marker durch die verwendeten hCB-ECFCs über eine *in vitro* - Expansion von bis zu 27 seriellen Passagen analysiert, um die Stabilität des mRNA-Expressionsprofils während der Zellkultur zu untersuchen (siehe Abschnitt 4.1). Im Anschluss daran erfolgt durch mittel- und langfristige Besiedlungsassays ein Vergleich der unterschiedlichen HFM-Typen und Kulturprotokolle unter qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten, um die am besten zur HFM-Endothelialisierung geeignete Kombination schrittweise einzugrenzen (siehe Abschnitt 4.2). Dabei wird die Etablierung einer möglichst konfluenten und vitalen Schicht endothelialer Zellen auf der

äußeren Oberfläche der HFMs angestrebt; eine Beeinflussung des Besiedlungsergebnisses könnte sowohl durch den eingesetzten HFM-Typ als auch durch das angewandte Kulturprotokoll möglich sein. Unter Berücksichtigung der ersten Ergebnisse wird zusätzlich untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem zellulären Verteilungsmuster auf der Membranoberfläche und der Integrität einer Albumin / Heparin-Beschichtung der verwendeten PMP-HFMs besteht. Da durch den Kontakt mit dem synthetischen HFM-Polymer oder den während der Endothelialisierung auftretenden Scherstress auch eine Veränderung des zellulären Aktivierungszustandes sowie der Responsivität gegenüber proinflammatorischen Stimuli möglich sein könnte, erfolgt anschließend eine Analyse der zellulären mRNA-Expression sowohl direkt nach Abschluss der HFM-Besiedlung als auch nach mehrstündiger Zytokinstimulation. In diesem Kontext sind vor allem solche Veränderungen von Bedeutung, die auf eine Voraktivierung des endothelialen Zellverbandes (d.h. eine Reduktion der antithrombogenen und antiinflammatorischen Eigenschaften) oder auf eine Veränderung der physiologischen Aktivierbarkeit hinweisen könnten.

Das auf diesem Wege optimierte Protokoll zur Besiedlung polymerer Gasaustausch-HFMs mit *in vitro* expandierten, endothelialen Zellen humaner Herkunft (hCB-ECFCs) stellt als Voraussetzung für Folgeexperimente einen entscheidenden Schritt in der Entwicklung der Biohybridlunge dar. Eine unabdingbare Voraussetzung für die weitere Eignung der endothelialisierten HFMs ist jedoch die Aufrechterhaltung der etablierten Einzelzellschicht unter physiologischen Bedingungen, zu denen unter anderem die *in vivo* vom Blutfluss hervorgerufenen Scherkräfte gehören werden. Vor diesem Hintergrund erfolgen im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit erste konsekutive Versuche (siehe Abschnitt 4.4): Die Gasaustausch-HFMs werden gemäß dem zuvor optimierten Protokoll endothelialisiert, um sie danach in einem maßangefertigten, dem iLA-Membranoxygenator nachempfundenen Bioreaktor definierten Volumenflussbedingungen durch strömendes Kulturmedium auszusetzen. Im Anschluss daran werden die Zahl der adhärenten hCB-ECFCs und die mRNA-Expression des endothelialen Zellverbandes in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit und der Dauer der Flussexposition untersucht. Auf Grund der hierdurch gewonnenen Erkenntnisse wird schließlich auch getestet, ob die hCB-ECFCs an einen graduell zunehmenden Volumenfluss adaptiert werden können, um so die Zellretention auf den HFM-Oberflächen unter Flussbedingungen zu verbessern.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

Eine Auflistung aller verwendeten Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sowie der jeweiligen Bezugsquelle findet sich im Anhang (siehe Abschnitt 9.1).

3.2 Zellkultur

3.2.1 Isolation endothelialer koloniebildender Zellen

Zur Isolation der endothelialen Zellen wurden humane Nabelschnurblutspenden verwendet, die nach Einwilligung der Eltern gewonnen und vom Norddeutschen Knochenmark- und Stammzellspender-Register zur Verfügung gestellt wurden. Die weitere Prozessierung fand gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover anonymisiert statt. Die Nutzung des Spendermaterials für Studienzwecke wurde der Ethikkommission angezeigt.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Zellen wurden bereits für frühere Experimente der Arbeitsgruppe Biohybridlunge verwendet; das Isolationsprotokoll wurde von Hess *et al.* etabliert [32]. Zunächst erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll-Trennlösung eine Separation der mononukleären Zellphase aus dem Spendermaterial. Das heparinisierte Nabelschnurblut (25 IE Heparin / mL) wurde dafür im Volumenverhältnis 1 : 1 mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) verdünnt. Anschließend wurden in einem 50-mL-Probengefäß jeweils 15 mL der Biocoll-Trennlösung mit je 10 mL der verdünnten Blutprobe langsam überschichtet und bei 800 *g* und Raumtemperatur für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Die mononukleäre Interphase wurde in ein weiteres 50-mL-Probengefäß überführt, mit PBS auf ein Volumen von 35 mL aufgefüllt und bei 400 *g* für weitere 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das zelluläre Sediment in endothelzellspezifischem Kulturmedium (*endothelial growth medium - 2*, EGM-2) resuspendiert, welches durch Supplementierung des proprietären Clonetics *endothelial basal medium - 2* (EBM-2) der Firma Lonza hergestellt und auch zur weiteren Kultivierung der Zellen verwendet wurde. Die Isolate wurden nach Bestimmung der Zellzahl mittels elektronischem Zählgerät (*CASY Cell Counter + Analyser System Model TT*, Firma Innovatis) mit einer Dichte von 10^5 Zellen / mL in mit 1%iger Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Zur Zusammensetzung und Lagerung aller verwendeten Medien und Lösungen siehe Tabelle 3.

Kulturmedium (EGM-2)	500 mL EBM-2	(Lonza)
	EGM-2 SingleQuots	(Lonza)
	10 mL FCS	
	2 mL hFGF-B	
	0,5 mL VEGF	
	0,5 mL hEGF	
	0,5 mL R3-IGF-1	
	0,5 mL Ascorbinsäure	
	0,5 mL Heparin	
	0,2 mL Hydrocortison	
	5 mL Penicillin / Streptomycin	(Biochrom)
Stoppmedium	500 mL DMEM	(Invitrogen)
	50 mL FCS	(Invitrogen)
	5 mL Penicillin / Streptomycin	(Biochrom)
Einfriermedium	90% FCS	(Invitrogen)
	10% DMSO	(Sigma-Aldrich)
Gelatine (1%)	1 g Gelatine	(Sigma-Aldrich)
	100 mL Reinstwasser	(Millipore)
PBS	2 Tbl. PBS	(Sigma-Aldrich)
	400 mL Reinstwasser	(Millipore)
Trypsin-EDTA (1×)	40 mL Trypsin-EDTA (10×)	(PAA Laboratories)
	400 mL PBS	

Tab. 3: In der Routine-Zellkultur verwendete Medien und Lösungen. Alle fertigen Zubereitungen (linke Spalte) wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert, ausgenommen Trypsin-EDTA (1×), das bei –20 °C aufbewahrt wurde. Die Herstellung des Einfriermediums erfolgte stets unmittelbar vor Verwendung.

Die zelluläre Adhäsion und das Zellwachstum wurden täglich phasenkontrastmikroskopisch kontrolliert. Sichtbare Gruppen adhärenter Zellen wurden nach 1 – 2 Wochen anhand der charakteristischen, pflastersteinartigen Morphologie humaner Endothelzellen als endotheliale koloniebildende Zellen (*human cord blood - derived endothelial colony - forming cells*, hCB-ECFCs) identifiziert. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Zellkulturmedium alle zwei bis drei Tage durch frisches EGM-2 ersetzt.

3.2.2 Expansion und serielle Passagierung

Auch während der Routinekultur wurden Proliferation und Morphologie der hCB-ECFCs täglich evaluiert sowie Mediumwechsel in zwei- bis dreitägigen Intervallen durchgeführt. Eine Subkultivierung erfolgte regelhaft bei Erreichen eines Konfluenzgrades von ca. 80%. Nach Absaugen des verbrauchten Kulturmediums wurde der Zellrasen sorgfältig mit auf 37 °C vorgewärmter PBS (8 mL) gewaschen und mit 1× konzentrierter Trypsin-Ethylendiamintetraacetat-Lösung (Trypsin-EDTA, 6 mL, 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA) für

ca. 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde durch phasenkontrastmikroskopische Kontrolle sichergestellt. Anschließend wurde die Trypsinierungsreaktion durch Zugabe des dreifachen Volumens an vorgewärmtem Stoppmedium (18 mL) terminiert, die Zellsuspension in ein 50-mL-Probengefäß überführt und für 10 min bei 325 *g* zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde nach Ende der Zentrifugation vorsichtig dekantiert, das sedimentierte Zellpellet in vorgewärmtem EGM-2 resuspendiert und die Zahl der Zellen via CASY-Zählgerät elektronisch bestimmt. Die Wiederaussaat erfolgte mit einer Dichte von $6-8 \times 10^3$ hCB-ECFCs / cm^2 in mit 1%iger Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen.

3.2.3 Kryokonservierung

Im Anschluss an eine Expansion der isolierten hCB-ECFCs über vier bis sieben serielle Passagen wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dafür wurden sie (wie unter 3.2.2 beschrieben) trypsiniert, nach der elektronischen Zählung jedoch nicht in EGM-2, sondern zu je 10^6 Zellen / mL in 90% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und sofort auf Eis gelagert. Initial erfolgte die Kühlung für 24 h bei –80 °C in einer Einfrierbox, danach wurden die Zellen im Stickstofftank eingelagert.

Zur Inkulturnahme kryokonservierter hCB-ECFCs wurden diese im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, noch im Kryoröhrchen mit 1 mL Stoppmedium versetzt und in ein 50-mL-Probengefäß überführt. Anschließend wurde die Suspension mit weiteren 9 mL Stoppmedium aufgefüllt und bei 325 *g* für 10 min zentrifugiert. Die weitere Verfahrensweise entsprach der regulären Passagierung in Kultur gehaltener hCB-ECFCs (siehe Abschnitt 3.2.2), jedoch ohne eine erneute Zellzahlbestimmung vor der Aussaat.

3.3 Phänotypisierung langzeitexpandierter hCB-ECFCs

Die Expression charakteristischer endothelialer Marker im Verlauf einer Expansion über 27 serielle Passagen wurde auf mRNA-Ebene durch eine Extraktion der zellulären RNA und anschließende Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion (*reverse transcription - polymerase chain reaction*, RT-PCR) untersucht.

3.3.1 RNA-Extraktion

3.3.1.1 Aussaat und Lyse

Nach erfolgter Trypsinierung (siehe Abschnitt 3.2.2) wurden Suspensionen von je 5×10^4 hCB-ECFCs / mL der Passagen 7, 17 und 27 auf mit 1%iger Gelatine vorbeschichteten

Sixwell-Platten ausgesät. Pro Well wurden 1,5 × 10^5 Zellen in einem Volumen von 3 mL EGM-2 aufgebracht und über 48 h bis zum Erreichen von Konfluenz bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Zum Lysieren der hCB-ECFCs wurde der im RNA-Extraktionskit enthaltene Puffer den Anweisungen des Herstellers entsprechend mit β-Mercaptoethanol versetzt (siehe Tabelle 4). Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurde jedes Well mit 600 µL Lyse-Puffer gefüllt; mit einem Schaber wurde der Zellrasen abgelöst und homogenisiert. Die Lysate wurden in 1,5-mL-Reaktionsgefäßen aufbewahrt und bis zur weiteren Prozessierung bei –80 °C eingefroren.

Lyse-Puffer	1 mL RLT-Puffer 10 µL β-Mercaptoethanol	(Qiagen) (Invitrogen)
DNase I	lyophilisierte RNase-freie DNase I 550 µL RNase-freies Wasser	(Qiagen) (Qiagen)
DNase/Puffer-Lösung	10 µL DNase I 70 µL RDD-Puffer	(Qiagen) (Qiagen)

Tab. 4: Zur RNA-Extraktion verwendete Lösungen. Während der Lyse-Puffer und die DNase/Puffer-Lösung stets direkt vor Gebrauch angesetzt wurden, wurde die DNase I nach Zugabe von RNase-freiem Wasser bei –20 °C gelagert.

3.3.1.2 RNA-Isolation aus den Lysaten

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* der Qiagen GmbH gemäß den Anweisungen des Herstellers. Zunächst wurden die Lysate im Volumenverhältnis 1 : 1 mit 70%igem Ethanol versetzt und durch ausgiebiges Vortexen homogenisiert. Es schlossen sich – abhängig vom Ausgangsvolumen – fünf bis sechs Zentrifugationsschritte bei 16 200 *g* an, die mit den Spin-Säulen und verschiedenen Waschpuffern des *RNeasy Mini Kit* durchgeführt wurden. Die in den Lysaten enthaltene RNA wurde dadurch an die Silicamembranen der Spin-Säulen adsorbiert und von Verunreinigungen befreit. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, fand während der Isolationsprozedur ein DNA-Verdau mit dem *RNase-Free DNase Set* der Qiagen GmbH statt. Den Instruktionen des Herstellers entsprechend wurde jede Probe mit 80 µL DNase/Puffer-Lösung (siehe Tabelle 4) versetzt, welche direkt auf die Membran der Spin-Säule gegeben wurde, und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. In einem finalen Zentrifugationsschritt wurde die aufgereinigte RNA in 30 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Die erhalte RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt und die gewonnene RNA bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C aufbewahrt.

3.3.2 Synthese der komplementären DNA

Pro Probe wurden bis zu 500 ng der extrahierten RNA durch reverse Transkription mit dem *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Fermentas in die komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. Zuerst wurde ein entsprechendes Volumen RNA-Lösung mit nukleasefreiem Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-Wasser) auf ein Gesamtvolumen von 10 µL aufgefüllt und 1 µL Primerlösung zugefügt. Als Primer der Reaktion wurden zufällig generierte Nukleotid-Hexamere (*random hexamer primer*) mit einer Konzentration von 0,2 µg/µL verwendet. Zur Auftrennung möglicher RNA-Sekundärstrukturen wurden die Proben für 5 min auf 65 °C erhitzt, im Anschluss sofort auf 4 °C gekühlt und bis zur Fortführung der cDNA-Synthese auf Eis gelagert. Den Herstellerangaben folgend wurde jede Probe um

- 4 µL Reaktionspuffer 5×
- 2 µL dNTP-Mix [10 mM]
- 1 µL *RiboLock* RNase-Inhibitor [20 U/µL] sowie
- 1 µL *Moloney-Murine Leukemia Virus (M-MuLV)* Reverse Transkriptase [200 U/µL]

ergänzt und die Synthese fortgesetzt. Von jeder RNA-Probe wurde eine Negativkontrolle mit identischer Zusammensetzung, jedoch ohne reverse Transkriptase angelegt (sog. RT^--Kontrolle). Die Hybridisierung der hexameren Primer wurde bei 25 °C für 5 min durchgeführt, gefolgt von der reversen Transkription bei 42 °C für 60 min. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (70 °C für 5 min) terminiert. Sowohl die synthetisierten cDNAs als auch die RT^--Kontrollen wurden im Volumenverhältnis 1 : 10 mit *Aqua ad iniectabilia* verdünnt und bei –20 °C gelagert.

3.3.3 Kontrolle des Syntheseerfolges

Das Ergebnis der cDNA-Synthese wurde für jede Probe und korrespondierende RT^--Kontrolle durch Untersuchung der Expression des ubiquitären Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in einem PCR-Assay überprüft. Pro Reaktionsansatz wurden für diese PCR verwendet:

- 11,75 µL *Aqua ad iniectabilia* (B. Braun)
- 5 µL *Green GoTaq* Reaktionspuffer 5× (Promega)
- 1 µL dNTPs [10 mM] (Fermentas), siehe Tabelle 5
- 1 µL *forward*-Primer [10 pmol/µL] (Eurofins MWG Operon)

- 1 µL *reverse*-Primer [10 pmol/µL] (Eurofins MWG Operon)
- 0,25 µL *GoTaq* DNA-Polymerase [5 U/µL] (Promega)
- 5 µL cDNA-Lösung bzw. RT⁻-Kontrolle als Template

Die Primerkonzentration betrug in jedem Reaktionsansatz 0,4 µM, die Primersequenzen und erwarteten Produktgröße sind in Tabelle 6 zu finden. Nach einem initialen Denaturierungsschritt (2 min bei 95 °C) wurde die Amplifikation wie folgt durchgeführt: 30 s Denaturierung bei 95 °C, 1 min Hybridisierung bei 55 °C sowie 30 s Elongation bei 72 °C über 35 Zyklen, gefolgt von einem finalen Elongationsschritt über 5 min bei 72 °C und Kälteinaktivierung der Polymerase bei 4 °C.

dNTPs [10 mM]	100 µL dATP [100 mM]	(Fermentas)
	100 µL dGTP [100 mM]	(Fermentas)
	100 µL dCTP [100 mM]	(Fermentas)
	100 µL dTTP [100 mM]	(Fermentas)
	600 µL Reinstwasser (nukleasefrei)	(Millipore)
Primer [10 pmol/µL]	10 µL Primer-Stocklösung [100 pmol/µL]	(Eurofins)
	90 µL Aqua ad iniectabilia	(B. Braun)
TAE-Puffer (25×; pH 8,0)	121 g Tris-Base [1 M]	(Carl Roth)
	28,6 mL Eisessig [25 mM]	(Carl Roth)
	9,3 g EDTA [25 mM]	(Sigma-Aldrich)
	971,4 mL Reinstwasser	(Millipore)
	HCl [1 M] zur pH-Einstellung	(Merck)
	NaOH [1 M] zur pH-Einstellung	(Merck)
TAE-Puffer (1×)	80 mL TAE-Puffer (25×)	
	1920 mL Reinstwasser	(Millipore)
Agarose-Gel (1,5%)	1,5 g Agarose	(Carl Roth)
	100 mL TAE-Puffer (1×)	
	5 µL (0,005%) Ethidiumbromid	(Sigma-Aldrich)

Tab. 5: Chemikalien und Lösungen für die RT-PCR. Sowohl die dNTP- als auch die Primerlösungen wurden bei –20 °C gelagert, die TAE-Puffer bei Raumtemperatur. Das Agarose-Gel wurde vor Verwendung durch Aufkochen von Agarose und TAE-Puffer (1×) hergestellt; das Ethidiumbromid erst nach vollständiger Lösung der Agarose zugegeben.

Die PCR-Produkte wurden auf 1,5%igem Agarose-Gel aufgetragen und in 1× TAE-Puffer (siehe Tabelle 5) mit 0,005% Ethidiumbromid bei 130 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Analyse der Bandenmuster erfolgte unter UV-Licht; ein repräsentatives Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt. Als DNA-Standard diente die *Eurogentec SmartLadder*. Nur cDNA-Lösungen mit positiver Fluoreszenz der GAPDH-Bande und negativer korrespondierender RT⁻-Kontrolle wurden für die nachfolgenden Experimente verwendet.

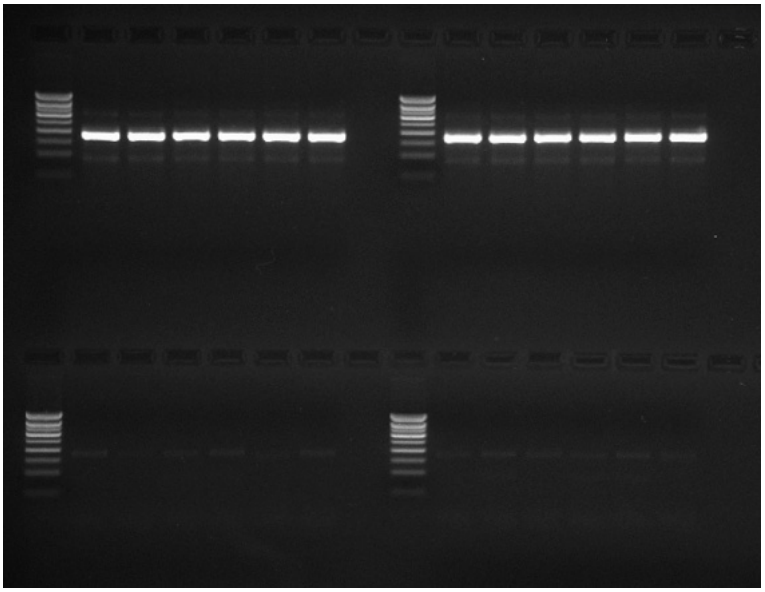


Abb. 5: Beispiel für die Gelelektrophorese einer GAPDH-PCR zur Kontrolle des cDNA-Syntheseerfolges (Fragmentgröße: 354 bp). In den beiden oberen Feldern wurden zwölf cDNA-Templates aufgetragen, darunter jeweils die korrespondierenden RT^--Kontrollen.

3.3.4 Untersuchung der Expression endothelialer Marker

Um die Stabilität des endothelialen Phänotyps der hCB-ECFCs trotz langfristiger *in vitro*-Expansion auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden nachfolgend weitere PCR-Assays durchgeführt. Als Primer dienten die mRNA-Sequenzen charakteristischer endothelialer Marker: von Willebrand-Faktor (vWF), die VEGF-Rezeptoren *fms-like tyrosine kinase-1* (flt-1) und *fetale liver kinase-1* (flk-1), die Adhäsionsproteine *vascular endothelial cadherin* (VEcad) und CD 31 sowie das Zytokin *endothelial / macrophage activating polypeptide-2* (EMAP-2). Das ubiquitär exprimierte Strukturprotein β-Aktin wurde als Positivkontrolle genutzt. Alle Primer wurden durch die Arbeitsgruppe Biohybridlunge etabliert [32]; die Primersequenzen und zu erwartenden Produktgrößen sind in Tabelle 6 angegeben. Die PCR-Reaktionen wurden wie unter 3.3.3 beschrieben angesetzt, wobei die Konzentration der verwendeten Primer ebenfalls 0,4 µM betrug. Zusätzlich wurden Negativkontrollen angelegt, die 5 µL *Aqua ad iniectabilia* (B. Braun) statt 5 µL cDNA-Template sowie den auch in den Positivkontrollen verwendeten β-Aktin-Primer enthielten.

Bis auf die Hybridisierungstemperatur und die Anzahl der Zyklen war das PCR-Protokoll identisch mit dem unter 3.3.3 beschriebenen GAPDH-Assay: Auf 2 min Denaturierung bei 95 °C folgten 30 Zyklen aus Denaturierung (30 s bei 95 °C), Hybridisierung (1 min, Temperatur s.u.) und Elongation (30 s bei 72 °C). Terminiert wurde die Reaktion nach einem finalen Elongationsschritt (5 min bei 72 °C) ebenfalls durch Kälteinaktivierung bei 4 °C. Die Hybridisierungstemperatur betrug abhängig vom eingesetzten Primer:

- 51 °C für vWF, flt-1, flk-1 und VEcad
- 60 °C für CD 31, EMAP-2 und β-Aktin (incl. Negativkontrolle)

Die anschließende Elektrophorese der PCR-Produkte erfolgte ebenfalls gemäß dem in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Protokoll.

Marker	**Richtung**	**Primersequenz (5' – 3')**	**Produktgröße [bp]**
GAPDH	*forward*	GGC CAA GGT CAT CCA TGA	354
	reverse	TCA GTG TAG CCC AGG ATG	
vWF	*forward*	CCT GCC TCT GAT GAG ATC	499
	reverse	GCA AAG CCC AAG GCA TCC	
flt-1	*forward*	ATC ATT CCG AAG CAA GGT GTG AC	122
	reverse	TCC TTC TAT TAT TGC CAT GCG CT	
flk-1	*forward*	TGG GAA CCG GAA CCT CAC TAT C	132
	reverse	GTC TTT TCC TGG GCA CCT TCT ATT	
VEcad	*forward*	GAG AAA GAA CTG GAC AGA G	329
	reverse	CTT GAC TGT GAT GTT GGC	
CD 31	*forward*	AGG TGA TAG CCC CGG TGG	412
	reverse	CTG CTT GGC CTT GGC TTT C	
EMAP-2	*forward*	TGG CTC CTC CAA ATG GGT CT	113
	reverse	AGG CTG GAT CTG CTC CCA AAT	
β-Aktin	*forward*	AGC CTC GCC TTT GCC GA	174
	reverse	CTG GTG CCT GGG GCG	

Tab. 6: Primerpaare für die RT-PCR und erwartete PCR-Produktgrößen nach [32].

3.4 Hohlfasermembran-Endothelialisierung

Sämtliche Endothelialisierungsversuche wurden mit nach obigem Protokoll isolierten und expandierten hCB-ECFCs der Passagen 9 bis 18 durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2).

3.4.1 Membrantypen

Es wurden vier kommerziell erhältliche HFM-Typen aus thermoplastischem Polymer getestet. Zwei davon basierten auf nicht-porösem Poly(4-methyl-1-penten) (PMP), das entweder beschichtet mit Albumin und Heparin (Membrantyp *Oxyplus*$^{A/H}$) oder unbeschichtet (Membrantyp *Oxyplus*) eingesetzt wurde. Die anderen zwei bestanden aus mikroporösem Polypropylen (PP) und unterschieden sich in der maximalen Größe ihrer Poren (Membrantypen *Oxyphan* und *Celgard*). Für eine Übersicht und weitere Spezifikationen siehe Tabelle 7, zur Illustration der Größenverhältnisse Abbildung 6.

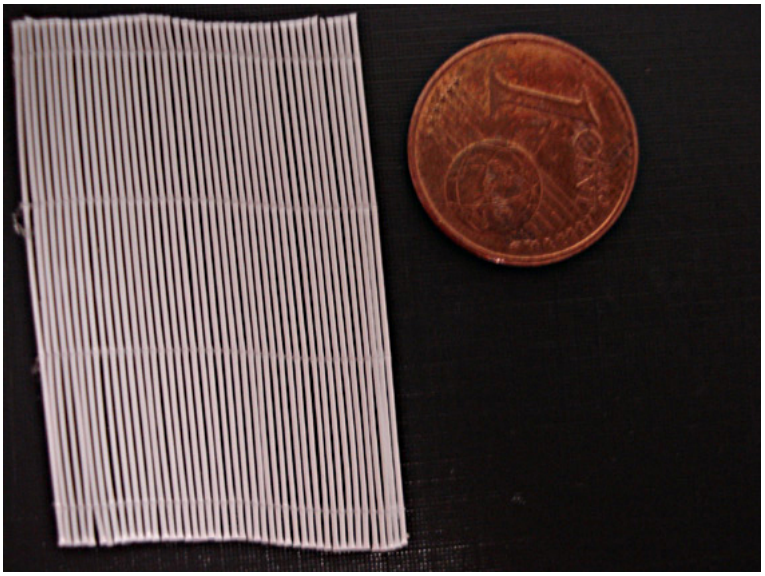


Abb. 6: Typischer HFM-Patch mit 380 µm äußerem Faserdurchmesser.

	Oxyplus$^{A/H}$	**Oxyplus**	**Oxyphan**	**Celgard**
Polymer:	PMP	PMP	PP	PP
Außendurchmesser:	380 µm	380 µm	380 µm	200 µm
Beschichtung:	Albumin / Heparin	keine	keine	keine
Max. Porengröße:	keine	keine	0,2 µm	0,03 µm

Tab. 7: Zur Endothelialisierung verwendete HFM-Typen.

3.4.2 Endothelialisierung über sechs Tage

Die hCB-ECFCs wurden über einen Gesamtzeitraum von sechs Tagen (144 h) auf den HFM-Oberflächen kultiviert, wobei stets zweiteilige Kulturprotokolle mit einer initialen Rotationsphase variabler Länge (s.u.) sowie einer darauf folgenden, statischen Kulturperiode über den restlichen Zeitraum angewandt wurden. Dafür wurden zunächst jeweils drei sterilisierte Membranpatches mit einer Seitenlänge von 3×3 cm in 15-mL-Probengefäße überführt und entlang deren Rundung ausgerichtet, sodass sie der Innenwand der Probengefäße locker anlagen (Abbildung 7 A). Nach Zugabe einer Suspension von 6×10^6 hCB-ECFCs in 15 mL EGM-2 (4×10^5 Zellen / mL) wurden die 15-mL-Probengefäße verschlossen und unter Zuhilfenahme entsprechend in Form gebogener 50-mL-Probengefäße einander gegenüberliegend in runden Glasbehältern befestigt (Abbildung 7 B). Diese Konstruktion wurde bereits bei den vorausgehenden Experimenten am dreidimensionalen Modell erfolgreich eingesetzt [33] und ermöglichte eine gleichzeitige Rotation von zwei 15-mL-Probengefäßen im selben Glasbehälter auf einer motorisierten Walze (*Universal Turning*

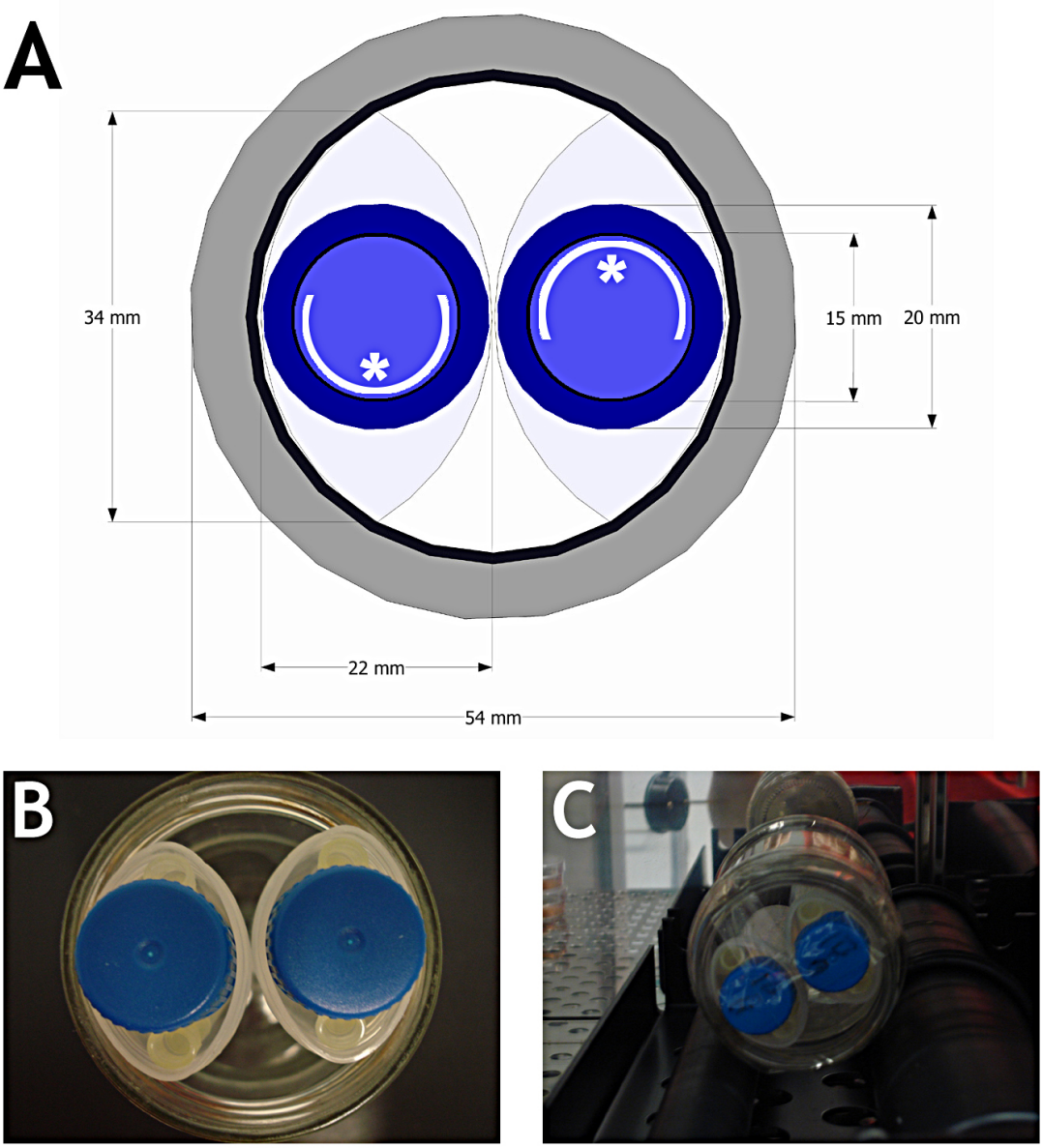


Abb. 7: (**A**) Schematische Darstellung und Abmessungen des zur Rotationsbesiedlung verwendeten Systems. Die 15-mL-Probengefäße, welche Hohlfasermembranen und Zellsuspension enthielten, sind blau dargestellt; der innere Kreis (hellblau) entspricht dem Lumen der Probengefäße (Innendurchmesser 15 mm). Die Sterne (*) kennzeichnen die Position der HFM-Patches (weiß), wobei stets eine luminale und eine wandseitige HFM-Oberfläche vorhanden waren. (**B**) Photographie des Systems. (**C**) Rotationsphase im Brutschrank. Der Glasbehälter mit zwei 15-mL-Probengefäßen rotiert auf einer motorisierten Walze.

Device, Firma Greiner). Hierbei konnten identische Rotationsgeschwindigkeiten angenommen werden, da der äußere Umfang der Glasbehälter (54 mm) dem Umfang der Walze des *Universal Turning Device* entsprach. Alle Versuche zur Kultivierung der hCB-ECFCs auf den polymeren HFMs wurden, den Bedingungen der Routine-Zellkultur entsprechend, bei 37 °C und 5% CO_2 durchgeführt.

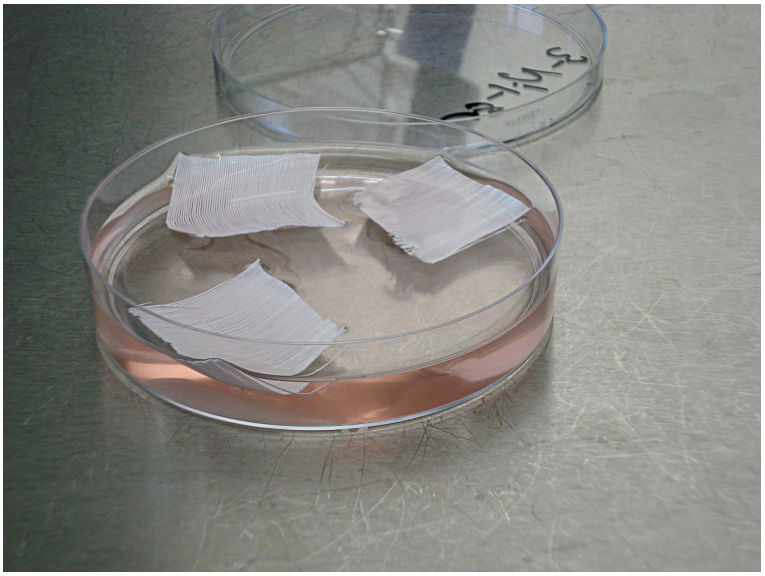


Abb. 8: Drei unter identischen Bedingungen besiedelte HFM-Patches während der statischen Kulturperiode.

An jedem der vier HFM-Typen wurden vier unterschiedliche Kulturprotokolle untersucht, die sich in der Rotationsgeschwindigkeit des *Universal Turning Device* sowie in der Dauer der Rotations- und Stasephase unterschieden, insgesamt also 16 Kombinationen. Die sechstägigen Endothelialisierungsversuche erfolgten bei einer Rotationsgeschwindigkeit von entweder 1 oder 20 rpm; die Rotationszeit betrug 24 h (Protokoll „Kurze Rotationszeit“, KR) bzw. 120 h (Protokoll „Lange Rotationszeit“, LR). Im Anschluss an diese initiale Phase wurden je drei HFM-Patches eines Typs, die im selben 15-mL-Probengefäß unter identischen Bedingungen endothelialisiert wurden, in eine Zellkulturschale mit 45 mL vorgewärmtem EGM-2 überführt (Abbildung 8). Anschließend wurde die Kultivierung der HFM-Patches für 120 h (KR) respektive 24 h (LR) unter statischen Bedingungen

Kultur-protokoll:	**initiale Rotationsphase**	**statische Kulturperiode**	**Rotationsgeschwindigkeit [rpm]**
KR-1	24 h	120 h	1
KR-20	24 h	120 h	20
LR-1	120 h	24 h	1
LR-20	120 h	24 h	20

Tab. 8: Kulturprotokolle zur HFM-Endothelialisierung über sechs Tage (144 h).

fortgesetzt (siehe Tabelle 8). Auf Grund eines schnell abfallenden pH-Wertes in den verschlossenen 15-mL-Probengefäßen, erkennbar am Farbumschlag des Zellkulturmediums, wurde das Medium während der Rotationsphase täglich durch frisches EGM-2 ersetzt. Während der fünftägigen statischen Kulturperiode des KR-Protokolls fand dagegen ein vollständiger Mediumwechsel nach 60 von 120 h statt. Nach Ablauf der vollständigen Endothelialisierungszeit von 144 h erfolgte die qualitative bzw. quantitative Auswertung der Membranbesiedlung durch Fluoreszenzmikroskopie der endothelialisierten HFMs (siehe Abschnitt 3.5) sowie Zählung der adhärenten Zellen (siehe Abschnitt 3.6).

3.4.3 Inkubation zellfreier Oxyplus$^{A/H}$-Kontrollmembranen

Um die Stabilität der Albumin / Heparin-Beschichtung auf den PMP-HFMs in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen zu analysieren, wurden zusätzlich unbesiedelte Oxyplus$^{A/H}$-Membranpatches evaluiert. Diese wurden entsprechend den in Abschnitt 3.4.2 aufgeführten Bedingungen inkubiert, jedoch in zellfreiem EGM-2. Basierend auf den Ergebnissen der vorangehenden Versuche (siehe Abschnitt 4.2.1) kam dafür das KR-Protokoll mit einer initialen Rotationsgeschwindigkeit von 1 rpm zur Anwendung. Eine qualitative Auswertung durch Proteinfärbung und anschließende Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abschnitt 3.5) erfolgte vor Beginn der Inkubation (0 h) sowie nach Ende der Rotationsphase (24 h) und nach Ablauf des gesamten Zeitraums (144 h).

3.4.4 Langzeit-Endothelialisierung über vier Wochen

Anschließend wurde die Beständigkeit der endothelialen Zellschicht auf den HFM-Oberflächen über einen vierwöchigen Zeitraum unter *in vitro* - Bedingungen untersucht. Während dabei für die quantitative Analyse (Zellzählung) HFM-Patches von 2×2 cm Seitenlänge verwendet wurden, kamen bei der qualitativen Analyse größere HFM-Patches mit einer Seitenlänge von 3×4 cm zum Einsatz, da diese in einem Stahlrahmen fixiert und so für Übersichtsaufnahmen (Mosaik-Fluoreszenzmikroskopie) verwendet werden konnten. Es wurden die Besiedlungsmethoden bzw. -parameter angewandt, die in den vorausgehenden Versuchen das beste Ergebnis erzielt hatten (siehe Abschnitt 4.2.1), d.h. das KR-Protokoll mit einer initialen Rotationsgeschwindigkeit von 1 rpm (siehe Abschnitt 3.4.2). Alle HFM-Patches wurden nach 24 h Rotation aus den 15-mL-Probengefäßen in Zellkulturschalen mit jeweils 45 mL EGM-2 überführt und unter statischen Bedingungen weiter inkubiert. Einmal wöchentlich wurden die endothelialisierten HFMs in neue Kulturschalen mit je 45 mL frischem EGM-2 transferiert. Hierbei erfolgte auch eine phasenkontrastmikroskopische Inspektion der zu diesem Zeitpunkt verworfenen Zellkulturschalen. Die qualitative und quantitative Auswertung durch Mosaik-Fluoreszenzmikroskopie sowie Zellzählung (siehe Abschnitt 3.5 bzw. 3.6) fand nach 7, 14, 21 und 28 Tagen statt.

3.5 Färbung und Fluoreszenzmikroskopie

Die Morphologie, der Konfluenzgrad und die Viabilität der endothelialen Zellschicht auf den HFMs wurden durch Fluoreszenzmikroskopie qualitativ evaluiert. Gleichermaßen wurde auch die Integrität der Albumin / Heparin-Beschichtung unbesiedelter Oxyplus$^{A/H}$-HFMs fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

Experiment	**Verwendete Fluorochrome**
Endothelialisierung über sechs Tage	
Standardaufnahmen	Calcein-AM + Hoechst 33342
Übersichtsaufnahmen	Calcein-AM
Unbesiedelte Oxyplus$^{A/H}$-HFMs	TAMRA
Langzeit-Endothelialisierung	Calcein-AM
Flussversuche	Calcein-AM + Hoechst 33342 + TAMRA
Flusskonditionierung	Calcein-AM + Hoechst 33342 + TAMRA

Tab. 9: Übersicht der eingesetzten Färbelösungen nach Experiment.

Dazu wurden die zu färbenden HFM-Patches zunächst mit Dulbeccos phosphatgepufferter Salzlösung (*Dulbecco's phosphate buffered saline*, DPBS) gewaschen und im Anschluss in einer Sixwell-Platte mit je 5 mL Färbelösung pro Well für 20 min im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Die verwendeten Fluorochrome bzw. Färbelösungen sind im Anschluss aufgeführt; eine Übersicht, welche Färbungen bei welchem Experiment zum Einsatz kamen, findet sich in Tabelle 9. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die HFM-Patches erneut sorgfältig mit DPBS gewaschen, um überschüssige Färbelösung zu entfernen, und zur Fluoreszenzmikroskopie in die mit 6 mL DPBS gefüllten Wells einer weiteren Sixwell-Platte überführt. Zur Anfertigung der Mosaik-Übersichtsaufnahmen war es notwendig, die endothelialisierten HFMs in maßgefertigten Stahlrahmen zu fixieren. Während diese Spezialaufnahmen unter einem *Axio Observer.Z1* - Mikroskop mit *AxioCam HSm* erfolgten, wurden alle anderen Aufnahmen unter einem *Axio Observer.A1* - Mikroskop mit *AxioCam MRm* angefertigt. Die Anregungs- und Emissionsspektren der eingesetzten Fluorochrome finden sich in Tabelle 10. Die digitalen Graustufenbilder der einzelnen Fluoreszenzkanäle wurden unter Verwendung von *Adobe Photoshop 6.0* mit optimierter Farbbalance zu Farbbildern zusammengefügt.

	Wellenlänge [nm]		**Fluoreszenz**
	Max. Exzitation	**Max. Emission**	
Calcein-AM	494	514	grün
Hoechst 33342	350	461	blau
TAMRA	552	578	rot

Tab. 10: Spezifikationen der verwendeten Fluorochrome (Herstellerangaben).

3.5.1 Vitalfärbung (Calcein-AM)

Der Farbstoff Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM) ist spezifisch für vitale Zellen, da seine Fluoreszenz vom Vorhandensein aktiver intrazellulärer Esterasen abhängt: Nach Aufnahme in die Zelle wird das veresterte Fluorochrom gespalten und kann dann zweiwertige Ionen (insbesondere Ca^{2+}) komplexieren, was bei entsprechender Anregung zu einer Grünfluoreszenz führt (siehe Tabelle 10). Avitale Zellen verfügen nicht über eine solche Esterase-Aktivität.

Gemäß Herstellerangaben wurden zunächst 50 µg des lyophilisierten Calcein-AM in 50 µL DMSO gelöst. Anschließend wurden 10 µL dieser Lösung mit 10 mL DPBS versetzt, sodass die Färbelösung eine Endkonzentration von 1 µg/mL aufwies.

3.5.2 Kernfärbung (Hoechst 33342)

Eine Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit dem membrangängigen DNA-Interkalator Hoechst 33342 durchgeführt. Den Herstellerangaben entsprechend wurden stets 5 µL einer aliquotierten Lösung mit einer Konzentration von 10 µg/µL in 10 mL DPBS eingesetzt, d.h. die Endkonzentration des Interkalators in der Färbelösung betrug 0,5 µg/mL.

3.5.3 Proteinfärbung (TAMRA)

Das Rhodaminderivat 5-(und-6)-Carboxy-tetramethylrhodamin Succinimidylester (TAMRA) reagiert mit Aminogruppen und kann daher als unspezifischer Proteinfarbstoff verwendet werden. Dafür wurde, gemäß den Anweisungen des Herstellers, eine aliquotierte Stammlösung (5 mM) mit DPBS verdünnt. Die eingesetzte Endkonzentration betrug abhängig von den Versuchsbedingungen (siehe Tabelle 9):

- 100 µM TAMRA zur Färbung unbesiedelter Oxyplus$^{A/H}$-HFMs
- 25 µM TAMRA zur Färbung besiedelter Oxyplus$^{A/H}$-HFMs nach Flussexposition

3.6 Quantifikation und Prozessierung der adhärenten hCB-ECFCs

Die quantitative Auswertung der jeweiligen Endothelialisierungseffizienzen sowie der Zellverluste nach Flussexposition (siehe Abschnitt 3.9) erfolgte durch Trypsinierung und anschließende elektronische Zählung der adhärenten Zellen. Nachfolgend wurde zur weiteren molekularbiologischen Charakterisierung die RNA aus den hCB-ECFCs extrahiert und in cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt 3.7).

3.6.1 Zählung der adhärenten Zellen

Die endothelialisierten HFM-Patches wurden zunächst gründlich mit PBS gewaschen und in 15-mL-Probengefäßen mit je 3 mL Trypsin-EDTA (1×) für 5 min bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurde die Trypsinierungsreaktion durch Zugabe von je 9 mL Stoppmedium (siehe Tabelle 3) terminiert. Die dezellularisierten HFMs wurden unter konstantem Schütteln entfernt, die Zellsuspensionen für 10 min bei 325 *g* zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Die Resuspension der erhaltenen Zellpellets erfolgte in 1200 µL PBS. Gemäß Herstellerangaben wurden nachfolgend 200 µL dieser Suspension jeweils im Volumenverhältnis 1 : 50 mit 10 mL sterilfiltrierter *CASYton Solution* gemischt und die Zellzahl der Proben mit dem elektronischen Zählgerät *CASY Cell Counter + Analyser System Model TT* bestimmt. Nach der Langzeit-Endothelialisierung über vier Wochen erfolgte zusätzlich eine rechnerische Normalisierung der experimentell ermittelten Zellzahl auf die äußeren Mantelflächen der HFMs. Die Mantelflächen wurden dafür gemäß nachfolgender Formel berechnet:

$$M \;=\; 2\pi r \; l \; n$$

Hierbei entspricht die Mantelfläche eines HFM-Patches (M) dem Produkt aus dem äußerem Umfang einer Hohlfaser ($2\pi r$), der Länge der Faser (l) und der Anzahl der Hohlfasern im gesamten Patch (n).

3.6.2 Aufarbeitung für semiquantitative realtime-PCR

Die verbliebenen Zellsuspensionen wurden für weitere 10 min bei 325 *g* zentrifugiert und die Überstande vorsichtig abpipettiert. Im Anschluss wurden je 350 µL Lyse-Puffer (siehe Tabelle 4) zugegeben und die Lysate durch ausgiebiges Vortexen homogenisiert. Zur Lyse der hCB-ECFCs nach Flussexposition endothelialisierter Oxyplus$^{A/H}$-HFMs wurde ein geringfügig modifiziertes Verfahren angewandt, das in Abschnitt 3.9.4.3 näher beschrieben wird. RNA-Extraktion, DNA-Verdau, cDNA-Synthese, eine Kontrolle des Syntheseerfolges via GAPDH-PCR sowie die Lagerung der Proben bis zur weiteren molekularbiologischen Analyse erfolgten gemäß den in Abschnitt 3.3.1.2 bis 3.3.3 beschriebenen Standardvorgehensweisen.

3.7 Untersuchung des zellulären mRNA-Expressionsprofils

Mittels semiquantitativer *realtime*-PCR (qPCR) wurde das mRNA-Expressionsprofil der hCB-ECFCs nach sechstätiger Kultivierung auf den polymeren HFM-Patches untersucht, um einen möglichen Einfluss der HFMs und der verschiedenen Kulturprotokolle auf den zellulären Aktivierungszustand identifizieren zu können. Des Weiteren wurde dieses Verfahren verwendet, um das zelluläre Expressionsprofil nach proinflammatorischer Stimu-

lation (nur auf PMP-HFMs, siehe Abschnitt 3.8) sowie nach Flussexposition (nur auf Oxyplus$^{A/H}$-HFMs, siehe Abschnitt 3.9) zu untersuchen.

Wie schon bei der Phänotypisierung nach langfristiger Expansion kamen auch bei der qPCR nur cDNA-Proben als Templates zum Einsatz, die zuvor eine positive GAPDH-Bande in der RT-PCR und eine negative RT$^-$-Kontrolle (siehe Abschnitt 3.3.3) aufwiesen. Pro Reaktionsansatz wurden folgende Reagenzien verwendet:

- 12,5 µL ABsolute QPCR SYBR Green Mix 2× (ABgene)
- 5,5 µL *Aqua ad iniectabilia* (B. Braun)
- 1 µL *forward*-Primer [10 pmol/µL] (Eurofins MWG Operon)
- 1 µL *reverse*-Primer [10 pmol/µL] (Eurofins MWG Operon)
- 5 µL cDNA-Lösung bzw. *Aqua ad iniectabilia* (B. Braun)

Analysiert wurde die mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle *intercellular adhesion molecule - 1* (ICAM-1), *vascular cellular adhesion molecule - 1* (VCAM-1) und E-Selektin (*endothelial leukocyte adhesion molecule - 1*, ELAM-1) sowie der in die Blutgerinnung involvierten Thrombogenitätsmarker *tissue factor* (TF) und Thrombomodulin (TM). Ferner wurden auch die scherstressabhängig exprimierten Faktoren *endothelial nitric oxide syn-*

Marker	**Richtung**	**Primersequenz (5' – 3')**	**Produktgröße [bp]**
ICAM-1	*forward*	CTA CCT CTG TCG GGC CAG GA	132
	reverse	AGG CCT GCA GTG CCC ATT AT	
VCAM-1	*forward*	GGC GCC TAT ACC ATC CGA AA	156
	reverse	GAG CAC GAG AAG CTC AGG AGA A	
ELAM-1	*forward*	ATC CAG CCA ATG GGT TCG TG	114
	reverse	GAA GGC TCT GGG CTC CCA TT	
TF	*forward*	CCC GAA CAG TTA ACC GGA AGA	191
	reverse	GGA GTT CTC CTT CCA GCT CTG C	
TM	*forward*	GCC CAT GGG AGC TGG TTA GA	190
	reverse	GGC CTG ACT TGG CCT GCT AC	
eNOS	*forward*	CGG CGT GCT GCG GGA TCA GC	125
	reverse	CGC CCC GCA ACT GAC GCT CC	
KLF-2	*forward*	CGC ACA CAG GTG AGA AGC CC	203
	reverse	GGG CGT CCC GGC TAC ATG T	
ET-1	*forward*	TTG TGG CTT GCC AAG GAG CTC CA	129
	reverse	AGG AGC AGC GCT TGG ACC GG	
β-Aktin	*forward*	ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA	176
	reverse	GGG CCG GAC TCG TCA TAC TC	

Tab. 11: Primerpaare für die qpCR und erwartete PCR-Produktgrößen, teils nach [32].

thase (eNOS), *Krüppel-like factor - 2* (KLF-2) und Endothelin - 1 (ET-1) untersucht. Als *housekeeping*-Gen zur relativen Quantifizierung des jeweiligen Expressionsniveaus (siehe Abschnitt 3.7.1) diente β-Aktin. Die Primer für ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, TF, TM und eNOS wurden bereits durch die Arbeitsgruppe Biohybridlunge etabliert [32], während die Etablierung der KLF-2 - und ET-1 - Primer im Rahmen dieser Arbeit erfolgte. Sämtliche Primersequenzen und erwartete Größen der PCR-Produkte sind in Tabelle 11 aufgelistet; die Primerkonzentration im Reaktionsansatz betrug 0,4 µM. Um eine potentielle Amplifikation kontaminierender DNA-Sequenzen zu vermeiden, wurden ausschließlich Introngrenzen übergreifende Primer verwendet.

Nach einer ausgedehnten Denaturierungsphase (15 min bei 95 °C) wurde folgendes Protokoll in der qPCR angewandt: 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Hybridisierung bei 61 °C und 30 s Elongation bei 72 °C über 40 Zyklen; dabei erfolgte eine Fluoreszenzmessung am Ende jedes Zyklus. Nach einer verkürzten Denaturierungs- (15 s bei 95 °C) und Hybridisierungsphase (15 s bei 61 °C) schloss sich eine Schmelzkurvenanalyse mit schrittweiser Temperaturerhöhung und Fluoreszenzmessung in Intervallen von 0,5 °C an. Abschließend wurde die qPCR nach einer letzten Denaturierung für 15 s bei 95 °C durch Kälteinaktivierung bei 4 °C terminiert. Zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse wurde die Spezifität der Amplifikationsreaktion durch eigene Negativkontrollen für jedes Primerpaar sichergestellt, welche *Aqua ad iniectabilia* statt cDNA-Template enthielten.

3.7.1 Relative Quantifikation nach Pfaffl

Die relative Quantifikation der mRNA-Expression erfolgte gemäß der von Pfaffl etablierten Methode zur Effizienznormalisierung [129] mittels folgender Gleichung:

$$RE = \frac{E_T^{\,\Delta Ct_T}}{E_R^{\,\Delta Ct_R}} = \frac{E_T^{\,(Ct_{T_{con}} - Ct_{T_{exp}})}}{E_R^{\,(Ct_{R_{con}} - Ct_{R_{exp}})}}$$

Dabei wird die Änderung der mRNA-Expression eines Gens zwischen Experiment (exp) und Kontrolle (con) aus der Primerpaar-abhängigen Effizienz (E) der jeweiligen PCR-Reaktion und der Differenz der via qPCR ermittelten *cycle threshold*-Werte (ΔCt) ermittelt. Die relative Expression (RE) lässt sich dann durch das Verhältnis von Änderung der Expression des Zielgens (*target*, T) und Änderung der Expression des *housekeeping*-Gens (*reference*, R), in diesem Falle β-Aktin, ausdrücken.

Die Effizienz wurde für jedes Primerpaar durch eine Standardreihe mit definiertem, in Zehnerpotenzen absteigendem Gehalt an cDNA-Template experimentell ermittelt. Eine Effizienz von 100% bedeutet dabei eine exponentiellen Zunahme des DNA-Gehalts in der Probe abhängig von der Zahl der PCR-Zyklen (2^n, wobei n der Zyklenzahl entspricht),

d.h. eine Verdopplung des DNA-Gehalts während jedes Zyklus. Obwohl unter anderem die verbreitete $2^{-\Delta\Delta Ct}$-Methode auf der Annahme basiert, dass die jeweils verglichenen PCRs eine identische Effizienz von 100% aufweisen, wird dieser Wert unter Versuchsbedingungen für gewöhnlich nicht erreicht. Die Pfaffl-Normalisierung trägt somit vor allem der unterschiedlichen Effizienz verschiedener PCR-Primerpaare bzw. -Reaktionen Rechnung und steigert so die Vergleichbarkeit der relativen Expressionswerte.

Sämtliche Proben wurden in Duplikaten analysiert und das arithmetische Mittel beider *Ct*-Werte zur Berechnung der relativen Expression genutzt. Als einheitliche Kontrollgruppe für alle qPCR-Assays dienten unter Standardbedingungen, d.h. auf mit 1%iger Gelatine beschichtetem Zellkulturplastik, kultivierte hCB-ECFCs der Passage 7. Die qPCRs dieser Referenzgruppe wurden in Triplikaten durchgeführt; als Grundlage für die weiteren Berechnungen wurde ebenfalls ein arithmetischer Mittelwert gebildet.

3.8 Stimulation endothelialisierter PMP-HFMs mit rhuTNF-α

Die Fähigkeit der hCB-ECFCs, nach Kultivierung auf polymeren HFMs auf eine proinflammatorische Stimulation durch Zytokine wie z.B. TNF-α zu reagieren (sog. Aktivierungsfähigkeit), wurde durch Inkubation endothelialisierter HFM-Patches mit rekombinantem humanem Tumornekrosefaktor-α (rhuTNF-α) untersucht. Auf Grund der zu diesem Zeitpunkt bereits vorliegenden Ergebnisse (siehe Abschnitt 4.2.1 und 4.2.3) wurden die PP-HFMs Oxyphan und Celgard für dieses Experiment nicht mehr verwendet.

Die auf PMP basierenden Oxyplus$^{A/H}$- und Oxyplus-HFMs wurden gemäß dem KR-Protokoll mit einer initialen Rotationsgeschwindigkeit von 1 rpm besiedelt (siehe Abschnitt 3.4.2). Nach Ablauf der insgesamt sechstägigen Endothelialisierungszeit wurden die besiedelten HFM-Patches einzeln in die mit je 6 mL EGM-2 gefüllten Wells einer Sixwell-Platte überführt und darin mit 10 ng/mL rhuTNF-α für 6 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Im Anschluss erfolgten die Ablösung und Aufarbeitung der adhärenten hCB-ECFCs sowie die Analyse der mRNA-Expression via qPCR wie zuvor in den Abschnitten 3.6 und 3.7 beschrieben.

3.9 Analyse unter dynamischen Bedingungen (Flussexposition)

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Endothelialisierung der polymeren HFM-Patches mit *in vitro* expandierten hCB-ECFCs über unterschiedliche Zeiträume untersucht. Ferner wurden die auf den HFMs kultivierten Zellen auf mRNA-Ebene näher charakterisiert. Beides geschah vor dem Hintergrund, eine möglichst gut geeignete Kombination aus Besiedlungsprotokoll und HFM-Typ zu identifizieren, welche die Etablierung einer konflu-

enten, vitalen sowie antithrombogenen und antiinflammatorischen Zellschicht ermöglicht. Auch wurde das Verteilungsmuster der hCB-ECFCs auf den beschichteten PMP-HFMs (Oxyplus$^{A/H}$) mit der Integrität der Albumin / Heparin-Beschichtung verglichen. Ergänzend erfolgte eine Analyse der Aktivierbarkeit der hCB-ECFCs auf den unterschiedlichen PMP-HFMs (Oxyplus$^{A/H}$ und Oxyplus) durch proinflammatorische Stimulation mit rhuTNF-α. Die gesammelten Ergebnisse dieser Versuche (siehe Abschnitt 4.2) konnten die Voraussetzungen für konsekutive Experimente schaffen: Um zu untersuchen, ob die auf den HFM-Oberflächen etablierte Zellschicht unter dynamischen Bedingungen stabil bleibt, wurden die endothelialisierten Gasaustausch-HFMs in einem maßangefertigten Bioreaktor definierten Flussbedingungen ausgesetzt. Die möglichen Veränderungen im zellulären mRNA-Expressionsprofil wurden molekularbiologisch analysiert.

3.9.1 Flusskammersystem

Bei der Konstruktion des Bioreaktors wurde versucht, den Aufbau gängiger Oxygenatoren nachzubilden; Konzeption und Etablierung erfolgten in der Arbeitsgruppe Biohybridlunge. Dabei wurde ein Auftreten von Turbulenzen im strömenden Medium auf Grund einer computergestützten Rheologiesimulation ausgeschlossen [33]. Das Volumen der Flusskammer wurde auch in Anbetracht späterer Kleintierversuche geplant. Die neun Hauptbauteile und der Flussverlauf durch die Kammer sind in Abbildung 9 dargestellt: Zwischen zwei-

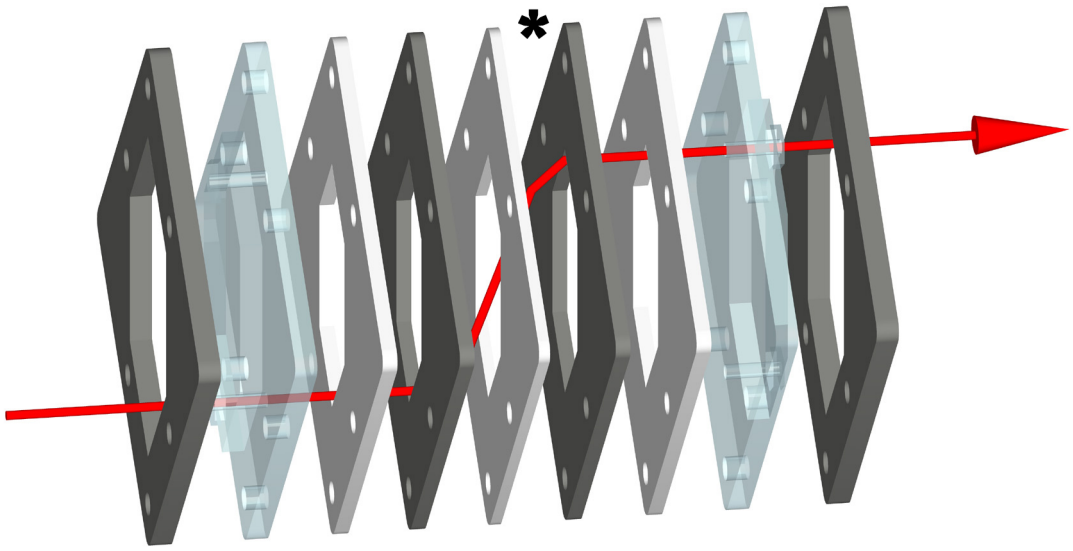


Abb. 9: Schematische Darstellung der einzelnen Komponenten des Flusskammersystems (Stahl = dunkelgrau, Silikon = weiß, Plexiglas = transparent). Der rote Pfeil visualisiert den Fluss des Mediums durch die Kammer; der Stern (*) markiert die Position der endothelialisierten HFM.

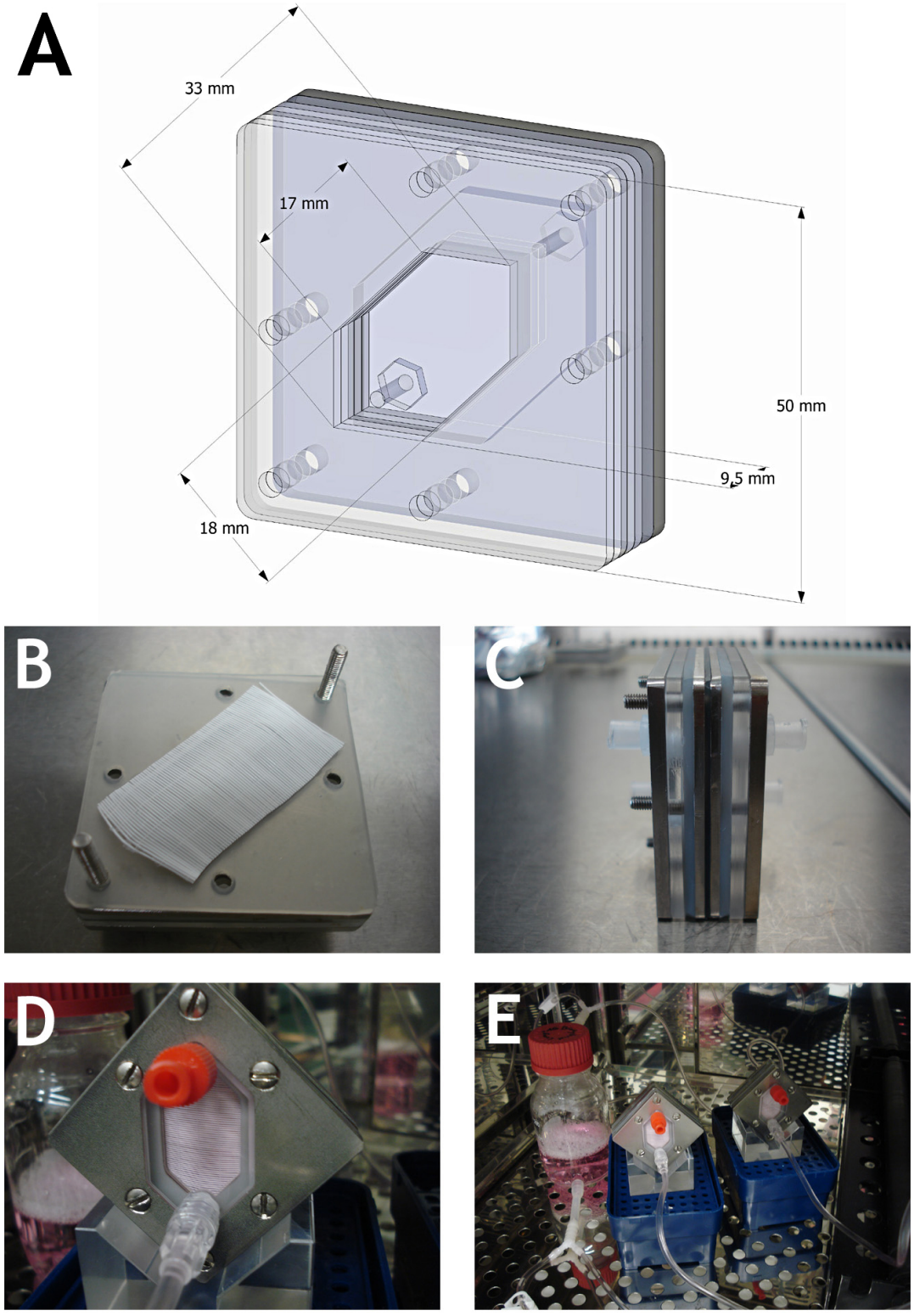


Abb. 10: (**A**) Abmessungen des Flusskammersystems (Deckplatten einseitig nicht dargestellt). (**B**) Besiedelter HFM-Patch vor dem Einspannen. (**C**) Fertig montierte Flusskammer (Seitenansicht). (**D**, **E**) Flussexposition endothelialisierter HFMs. Die Rollerpumpe (nicht im Bild) befindet sich direkt neben dem Brutschrank.

teiligen Deckplatten aus Stahl und Plexiglas, die mit je zwei Konnektoren für den Zu- bzw. Abfluss des Perfusionsmediums versehen waren, wurde die eigentliche Flusskammer durch drei Silikon- und zwei Stahllamellen gebildet und verfügte über ein errechnetes Volumen von 4,275 cm^3. Sechs Schrauben gewährleisteten Zusammenhalt und Dichtigkeit des Systems. Zwei der vier Konnektoren wurden stets verschlossen, sodass der Fluss des Perfusionsmediums durch die Kammer diagonal von unten nach oben erfolgte (roter Pfeil in Abbildung 9). Ein endothelialisierter HFM-Patch mit 8 cm^2 Patchfläche wurde jeweils zwischen den zentralen Silikon- bzw. Stahllamellen so eingespannt, dass eine hexagonale Patchfläche von insgesamt 4,5 cm^2 dem Volumenfluss ausgesetzt war. Die Abmessungen der Flusskammer und zusätzliche Aufnahmen zur Veranschaulichung der Experimente sind in Abbildung 10 zu finden. Einen Überblick über die zentralen Parameter der Flussversuche gibt Tabelle 12.

Volumen der Flusskammer:	4,275 cm^3
Flussexponierte HFM-Patchfläche:	4,5 cm^2
Durchmesser der Perfusionsschläuche:	3,17 mm
Durchmesser der Pumpenschläuche:	2,79 mm
Pumpentyp:	Rollerpumpe
Zahl der Pumpenköpfe:	8
Flussrichtung:	unidirektional
Flusskonfiguration:	mikropulsatil
Perfusionsmedium:	EGM-2

Tab. 12: Allgemeine Parameter der Flussexpositionsversuche.

3.9.2 Endothelialisierung der HFM-Patches

Auf Grund der im ersten Teil dieser Dissertation generierten Ergebnisse (siehe Abschnitt 4.2) wurden nur Oxyplus$^{A/H}$-HFMs, d.h. Albumin / Heparin-beschichtetes PMP, für die Flussexpositionsversuche verwendet. Zur sicheren Fixierung der Membranpatches in der Flusskammer war eine Patchgröße von 2×4 cm notwendig. Die Endothelialisierung erfolgte gemäß dem KR-Protokoll mit einer initialen Rotationsgeschwindigkeit von 1 rpm (siehe Abschnitt 3.4.2, insbesondere Tabelle 8), da sich dieses Endothelialisierungsprotokoll als am effektivsten herausgestellt hatte. Pro 15-mL-Probengefäß wurden wie zuvor stets drei HFMs gleichzeitig mit hCB-ECFCs besiedelt.

3.9.3 Flussexpositionsprotokolle

Nach Ende der sechstätigen Kultivierungszeit wurde eine der drei gemeinsam endothelialisierten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs als Referenz der Auswertung (s.u.) zugeführt. Die beiden übrigen Membranpatches wurden in separate Flusskammern eingespannt und darin für 6

bzw. 24 h einem definierten Volumenfluss ausgesetzt (Abbildung 10). Angelehnt an die Steuerung extrakorporaler Kreisläufe im klinischen Kontext und in Anbetracht der unter Idealbedingungen proportionalen Beziehung zwischen Scherstress und Flussrate wurde die Flussgeschwindigkeit im Bioreaktorsystem neben der Expositionszeit als zweite unabhängige Variable verwendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug 5 bzw. 50 mL/min. Bei einem Fluss von 5 mL/min wurde das Volumen der Flusskammer (4,275 mL) so etwa 1,17-mal pro Minute ausgetauscht. Unter klinischen Bedingungen, d.h. in einem Oxygenator mit einem angenommenen Volumen von 175 mL, würde eine identische Volumenaustauschrate bei einer Flussgeschwindigkeit von rund 204,75 mL/min erreicht werden (siehe Tabelle 13). Analog entsprächen 50 mL/min im Bioreaktorkreislauf einem zehnfach höheren Fluss von rund 2047,50 mL/min in einem klinisch eingesetzten Oxygenatorkreislauf. Als Perfusionsmedium kam EGM-2 zum Einsatz, wobei sich beide Flusskammern ein gemeinsames Glasreservoir mit insgesamt 100 mL EGM-2 teilten.

Flussrate [mL/min]	**Volumenaustauschrate [min^{-1}]**	**Oxygenatorfluss (175 mL) [mL/min]**
5	1,17	204,75
50	11,70	2047,50

Tab. 13: Flussraten im System sowie daraus errechnete Volumenaustauschraten in der Flusskammer (4,275 mL). Werden diese Volumenaustauschraten auf einen Oxygenator mit 175 mL Volumen bezogen, so entspräche der Fluss von 5 mL/min im Bioreaktorkreislauf rechnerisch einem Fluss von 204,75 mL/min im Oxygenatorkreislauf. Analog ergeben sich bei 50 mL/min zehnfach höhere Parameter.

Über separate Verbindungsschläuche aus Kunststoff wurde dieses Reservoir zuerst mit einer achtköpfigen Rollerpumpe der Firma Ismatec und mit den verschlossenen Flusskammern verbunden (Abbildung 11). Anschließend wurde das System sorgfältig entlüftet und der Perfusionskreislauf durch Verbindung der Flusskammern mit dem Reservoir geschlossen. Die Flussexpositionsversuche erfolgten bei 37 °C und 5% CO_2.

3.9.4 Auswertung

3.9.4.1 Qualitative Analyse

Eine qualitative Betrachtung der Auswirkungen der Flussexposition auf die endothelialisierten HFM-Patches erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie. Dazu wurden die Flusskammern nach Ablauf der Expositionszeit geöffnet, die HFMs vorsichtig entfernt und gemäß den in Abschnitt 3.5 aufgeführten Färbeprotokollen mit Calcein-AM, Hoechst 33342 und TAMRA gefärbt (siehe auch Tabelle 9). Die Aufnahmen der einzelnen Fluoreszenzkanäle

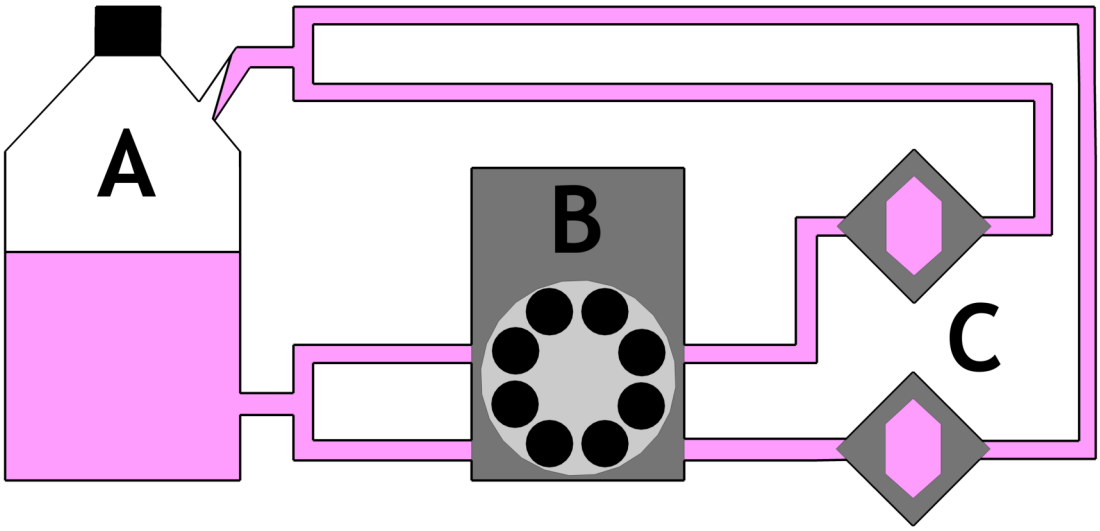


Abb. 11: Schematische Darstellung des Flusskreislaufs. Das Mediumreservoir (**A**) wurde über die Rollerpumpe (**B**) mit den beiden Flusskammern (**C**) verbunden. Alle Komponenten außer der Pumpe wurden im Brutschrank platziert.

wurden wie unter 3.5 beschrieben angefertigt und anschließend auf gleiche Art zu digitalen Farbbildern zusammengefügt.

3.9.4.2 Quantitative Analyse

Die rechteckigen HFM-Patches wurden nach abgeschlossener Endothelialisierung mit den Ecken in der Flusskammer fixiert (siehe Abschnitt 3.9.1 bzw. Abbildung 10). Um eine vergleichbare Quantifizierung zu ermöglichen, wurden diese Ecken vorsichtig mit einer Schere entfernt, sodass stets eine dem flussexponierten Areal entsprechende, hexagonale Patchfläche von 4,5 cm^2 in die quantitative Analyse einging. Die Auswertung erfolgte durch Trypsinierung und Zellzahlbestimmung wie in Abschnitt 3.6 beschrieben; pro Probe wurden in diesem Fall jedoch 4 mL Trypsin-EDTA (1×) und 12 mL Stoppmedium verwendet. Die Zahl der nach Flussexposition adhärenten hCB-ECFCs wurde als relative Zellzahl bezogen auf die nicht flussexponierte Referenzmembran angegeben.

3.9.4.3 Molekularbiologische Analyse

Um mögliche Auswirkungen der Flussexposition auf das zelluläre mRNA-Expressionsprofil zu untersuchen, wurden weitere qPCR-Assays durchgeführt. Die HFMs wurden dafür sofort nach Ablauf von sechs Stunden Expositionszeit gegenüber einem Fluss von 5 mL/min bzw. 50 mL/min aus den Flusskammern entfernt und mit PBS gespült. Nach vorsichtiger

Entfernung der zur Fixierung verwendeten Ecken wurden die HFM-Patches in 1,5-mL-Reaktionsgefäßen direkt mit je 350 µL Lyse-Puffer versetzt. Durch Vortexen wurde eine möglichst vollständige Lyse aller adhärenten Zellen angestrebt; anschließend wurden die HFMs unter konstantem Schütteln entfernt und die Lysate bis zur weiteren Prozessierung bei –80 °C gelagert. RNA-Extraktion, DNA-Verdau, cDNA-Synthese, GAPDH-PCR und die anschließende qPCR erfolgten nach den in Abschnitt 3.3.1.2 bis 3.3.3 sowie Abschnitt 3.7 beschriebenen Standardvorgehensweisen.

3.9.5 Flusskonditionierung

Abschließend wurde versucht, die Zahl der adhärenten hCB-ECFCs unter Flussbedingungen durch eine langsame Adaptation der Zellen an zunehmende Flussraten zu steigern. Eine initiale Flussrate von 1 mL/min wurde hierfür alle 2 h um 1 mL/min erhöht, sodass nach 8 h ein Fluss von 5 mL/min erreicht war, welcher für weitere 16 h aufrechterhalten wurde. Der Aufbau des Flusskammersystems und die Auswertung des Versuchs nach Ablauf der Gesamtexpositionszeit von 24 h wurden ansonsten wie in diesem Abschnitt beschrieben durchgeführt.

3.10 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben; die Anzahl der durchgeführten Experimente findet sich jeweils in der Beschriftung der Abbildungen. Zum Vergleich der unterschiedlichen Testgruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von *Tukey's honestly significant difference* - Test genutzt, um statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte zu identifizieren. Signifikante Abweichungen der Mittelwerte von vorgegebenen Referenzwerten wurden durch *Student's* Ein-Stichproben-*t*-Test ermittelt, wobei als Referenzwert 2×10^4 (in Abschnitt 4.2.3) bzw. 1,0 (in Abschnitt 4.2.4) verwendet wurde. Als Signifikanzniveau wurde stets ein p-Wert $< 0{,}05$ festgelegt. Alle statistischen Analysen wurden mit der Software *GraphPad Prism 5.01* durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Expansion und Charakterisierung der hCB-ECFCs

4.1.1 Routine-Zellkultur

Während der Zellkultur unter Routinebedingungen zeigten die isolierten hCB-ECFCs (Abbildung 12) auch nach einer *in vitro* - Expansion über mehr als 20 Passagen eine stabile Proliferationsaktivität. Die mittlere Passagedauer betrug 2,67 ± 0,54 Tage (n = 6). Dabei erwies sich die Wiederaussaat der Zellen mit einer Dichte von $6-8 \times 10^3$ hCB-ECFCs / cm^2 als geeignet, um im Rahmen der seriellen Passagierung eine kontinuierliche Proliferation zu gewährleisten. Eine konfluente Einzelzellschicht von hCB-ECFCs auf Gelatine-beschichtetem Zellkulturplastik führte zu einer minimalen Zelldichte von ca. 2×10^4 Zellen / cm^2.

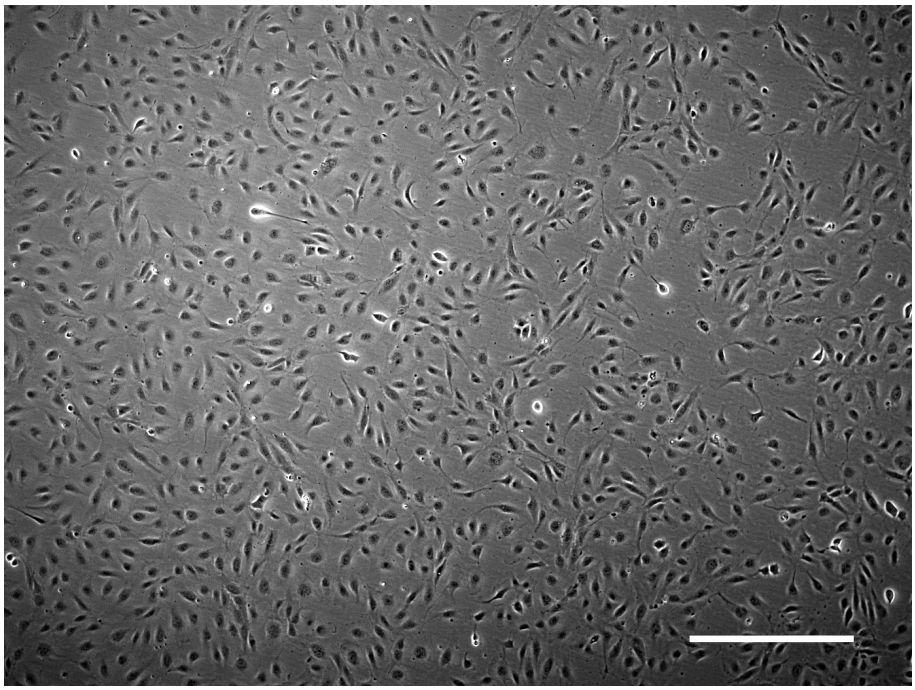


Abb. 12: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme subkonfluenter hCB-ECFCs der Passage 7 während der Zellkultur. Skalierung: 500 µm.

4.1.2 Expression endothelialer Marker nach Langzeitexpansion

Da die verwendeten Zellen auch in vorausgehenden Studien genutzt wurden, erfolgte bereits eine Validierung ihres endothelialen Phänotyps sowohl auf mRNA- als auch auf Prote-

inebene [32]. In der vorliegenden Arbeit wurde in Ergänzung dazu die mRNA-Expression nach einer *in vitro* - Expansion über bis zu 27 Passagen untersucht. Es zeigte sich, dass typische endotheliale Marker wie der vWF, die VEGF-Rezeptoren flt-1 und flk-1, die endothelialen Adhäsionsmoleküle VEcad und CD 31 sowie das Zytokin EMAP-2 auch in der 27. Passage noch exprimiert wurden (Abbildung 13). Die Bandenmuster der qualitativen RT-PCR deuteten auch darauf hin, dass es im Verlauf der Zellexpansion zu quantitativen Veränderungen in der mRNA-Expression einzelner Marker gekommen sein könnte. Beispielsweise stellte sich im abgebildeten Experiment ein gradueller Rückgang der vWF-Expression mit zunehmender *in vitro* - Kultivierungsdauer dar (Abbildung 13, P17 und P27), der sich jedoch nicht eindeutig reproduzieren ließ. Phasenkontrastmikroskopisch war beginnend nach frühestens 20 Passagen ein langsam progredienter Verlust der typischen, pflastersteinartigen Morphologie der hCB-ECFCs sichtbar.

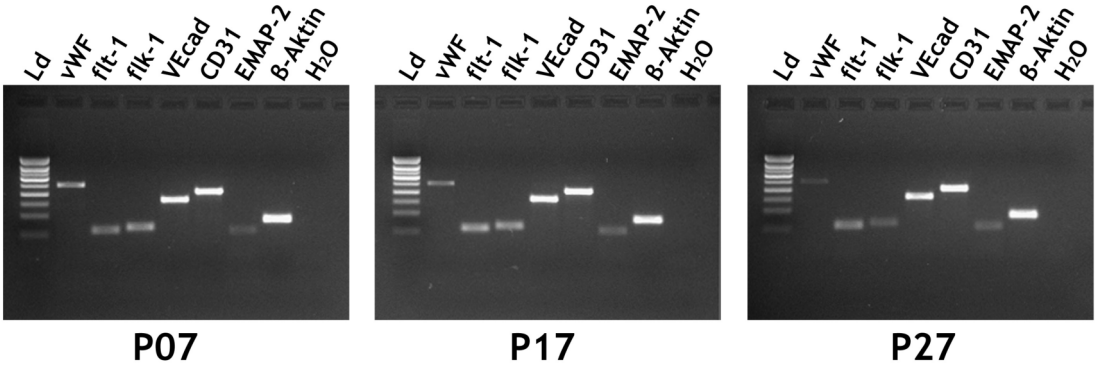


Abb. 13: RT-PCR zur Untersuchung des mRNA-Expressionsprofils von hCB-ECFCs nach *in vitro* - Expansion über 7, 17 oder 27 serielle Passagen (P). β-Aktin diente als Positivkontrolle. H_2O = Negativkontrolle ohne DNA-Template (Primer: β-Aktin). Ld = DNA-Standard (*Ladder*). Dargestellt sind repräsentative Bandenmuster von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten RT-PCRs.

4.2 Endothelialisierung polymerer Gasaustausch-HFMs

4.2.1 Vergleich unterschiedlicher HFM-Typen und Kulturprotokolle nach sechstägiger Endothelialisierung

Unabhängig vom verwendeten Endothelialisierungsprotokoll wiesen die auf mikroporösem PP basierenden HFM-Typen Oxyphan und Celgard lediglich eine geringe Zahl adhärenter hCB-ECFCs auf, während die auf nicht-mikroporösem PMP basierenden HFM-Typen Oxyplus und Oxyplus$^{A/H}$ ein qualitativ besseres Besiedlungsergebnis zeigten. Dabei gelang es nur auf den Albumin / Heparin-beschichteten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs, eine vitale und nahezu vollständig konfluente Einzelzellschicht mit pflastersteinartiger Morphologie zu etablieren, wie aus der Calcein-Färbung hervorging (Abbildung 14). Einzelne punkt- oder

streifenförmige Areale vor allem im Bereich der äußeren Hohlfaserscheitel waren jedoch auch auf diesem Membrantyp nicht vollständig mit vitalen hCB-ECFCs bedeckt. In diesen Bereichen konnten durch die Gegenfärbung mit Hoechst 33342 zumeist kernartige DNA-Rückstände nachgewiesen werden (Abbildung 14, A–C). Das Verteilungsmuster dieser zellfreien Areale auf den Oxyplus$^{A/H}$-HFMs wurde nachfolgend näher untersucht (siehe Abschnitt 4.2.2). Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, die unbeschichteten PMP-HFMs des Typs Oxyplus vergleichbar effektiv zu besiedeln (Abbildung 15). In ihrer Ausprägung war die auf diesem Membrantyp adhärente Zellschicht ausgesprochen variabel; das Erscheinungsbild reichte von Clustern mit außergewöhnlich hoher Zelldichte (Abbildung 15 C) über fleckförmige Verteilungsmuster bis hin zu komplett unbesiedelten Arealen (Abbildung 15 B, D). Ein spezifisches Muster ließ sich in der Verteilung der hCB-ECFCs auf den unbeschichteten PMP-HFMs nicht erkennen. Beide Typen von PP-HFMs (Abbildung 16 und 17) wiesen lediglich kleine Verbände adhärenter Zellen bzw. einige adhärente Einzelzellen bei weitgehend unbesiedelten Hohlfaser-Oberflächen auf. Höhere Zelldichten waren nur als manschettenähnliche Strukturen entlang der Verbindungsfäden sichtbar, insbesondere auf den PP-HFMs des Typs Celgard (Abbildung 17 C).

Gegenüber diesen auffälligen Unterschieden in Abhängigkeit vom eingesetzten HFM-Typ konnten anhand der Fluoreszenzmikroskopie keine qualitativen Auswirkungen durch das verwendete Kulturprotokoll oder die während der Endothelialisierung angewandte Rotationsgeschwindkeit identifiziert werden. Aus diesem Grund erfolgte eine zusätzliche Quantifizierung der adhärenten hCB-ECFCs (Abbildung 18), deren Ergebnisse insgesamt mit der vorausgehenden mikroskopischen Evaluation korrespondierten. Hierbei spiegelte sich insbesondere die qualitativ gute Endothelialisierbarkeit der Oxyplus$^{A/H}$-HFMs auch in einer höheren Zahl adhärenter Zellen auf Oxyplus$^{A/H}$ wider; alle anderen Membrantypen wiesen demgegenüber signifikant weniger adhärente hCB-ECFCs auf. Das KR-Kulturprotokoll (24 h Rotation gefolgt von 120 h Stase) führte auf beiden PMP-Membrantypen bei einer initialen Rotationsgeschwindigkeit von 1 rpm (Abbildung 18 A) sowie auf sämtlichen HFM-Typen bei einer initialen Rotationsgeschwindigkeit von 20 rpm (Abbildung 18 B) zu einer größeren Anzahl adhärenter Zellen als das LR-Protokoll, jedoch fiel diese Differenz nur in einem einzigen Fall (s.u.) statistisch signifikant aus. Ferner konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede abhängig von der Rotationsgeschwindigkeit bei ansonsten identischen Besiedlungsparametern festgestellt werden, obwohl eine allgemeine Tendenz zugunsten der geringeren Rotationsgeschwindigkeit (1 rpm) erkennbar war. Die insgesamt höchste Zahl adhärenter hCB-ECFCs wurde auf Oxyplus$^{A/H}$-HFMs erreicht, die unter Anwendung des KR-Protokolls endothelialisiert wurden. Eine statistisch signifikante Differenz zum LR-Protokoll fand sich dabei nur bei einer initialen Rotationsgeschwindigkeit von 1 rpm (Abbildung 18 A). Wie erwähnt konnte allerdings auch bei 20 rpm eine tendenziell höhere Zellzahl nach Anwendung des KR-Kulturprotokolls beobachtet werden (Abbildung 18 B).

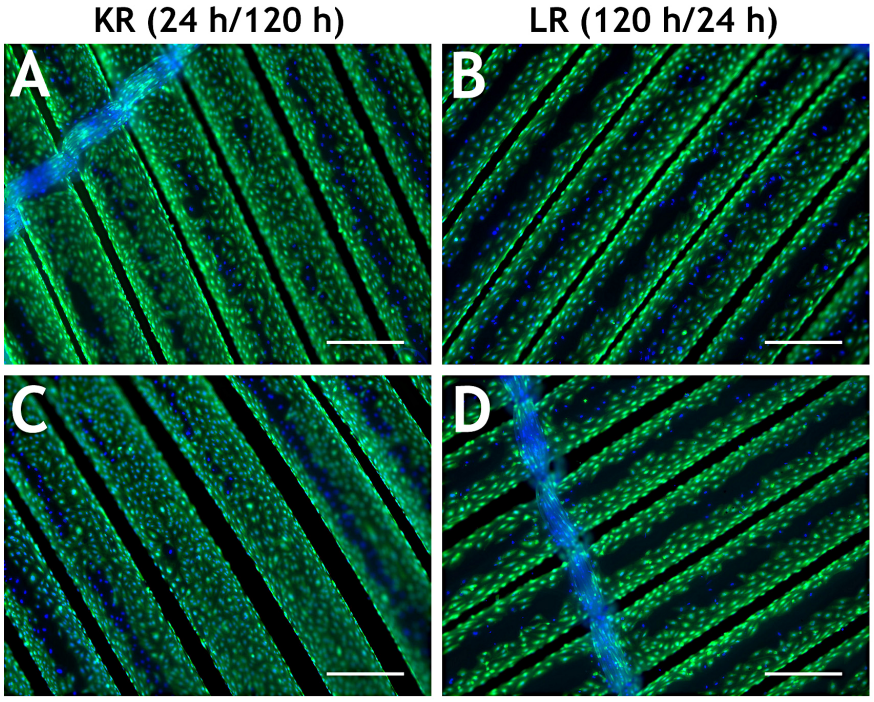


Abb. 14: Repräsentative Aufnahmen von PMP-HFMs des Typs **Oxyplus$^{A/H}$** nach Besiedlung mit hCB-ECFCs. Die Endothelialisierung erfolgte gemäß dem KR- (**A**, **C**) bzw. dem LR-Protokoll (**B**, **D**) über sechs Tage. Skalierung: 500 µm.

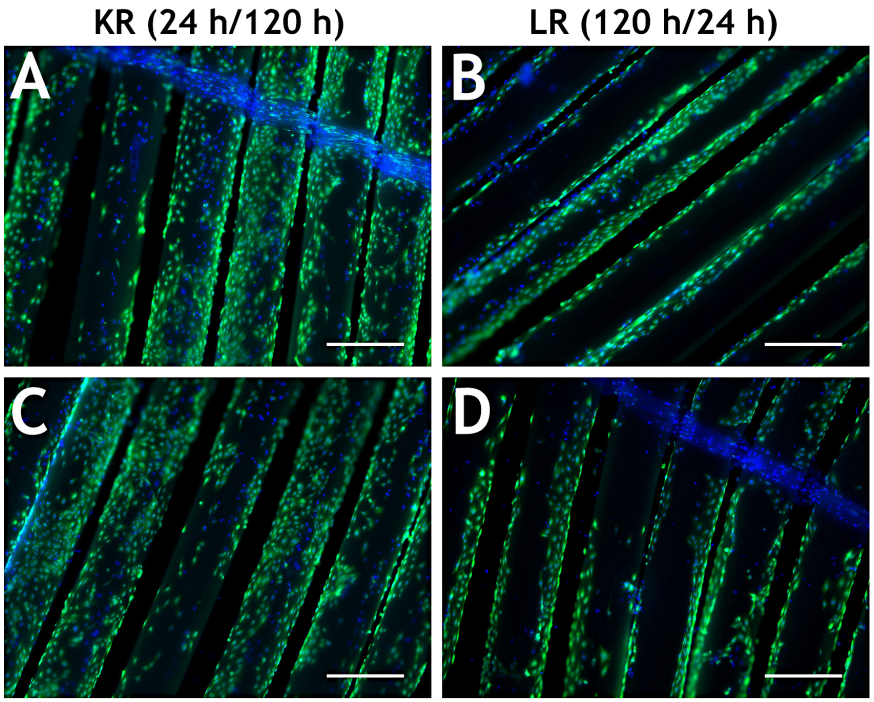


Abb. 15: Repräsentative Aufnahmen von PMP-HFMs des Typs **Oxyplus** nach Besiedlung mit hCB-ECFCs. Die Endothelialisierung erfolgte gemäß dem KR- (**A**, **C**) bzw. dem LR-Protokoll (**B**, **D**) über sechs Tage. Skalierung: 500 µm.

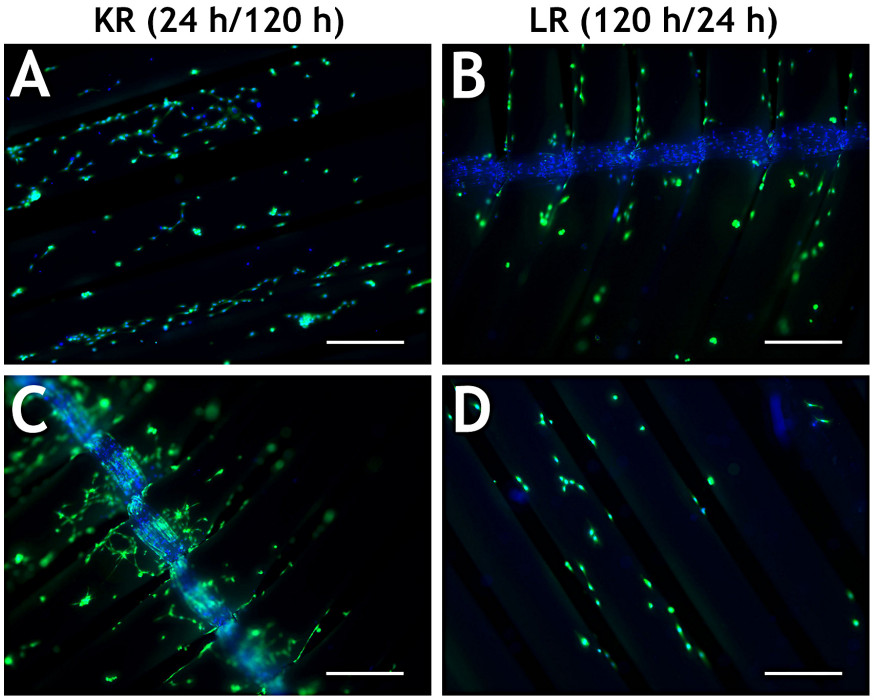


Abb. 16: Repräsentative Aufnahmen von PP-HFMs des Typs **Oxyphan** nach Besiedlung mit hCB-ECFCs. Die Endothelialisierung erfolgte gemäß dem KR- (**A**, **C**) bzw. dem LR-Protokoll (**B**, **D**) über sechs Tage. Skalierung: 500 µm.

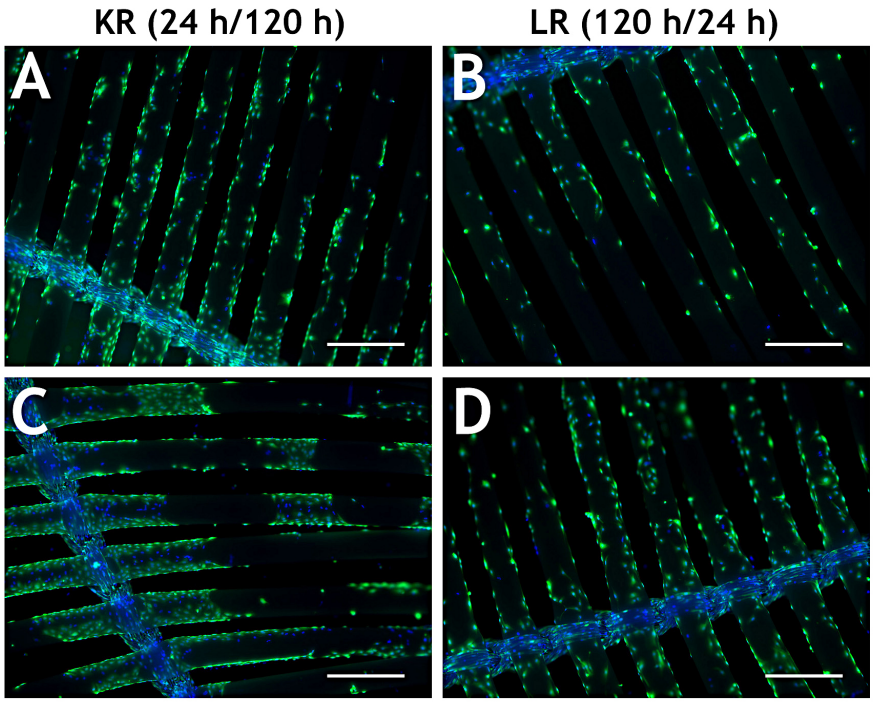


Abb. 17: Repräsentative Aufnahmen von PP-HFMs des Typs **Celgard** nach Besiedlung mit hCB-ECFCs. Die Endothelialisierung erfolgte gemäß dem KR- (**A**, **C**) bzw. dem LR-Protokoll (**B**, **D**) über sechs Tage. Skalierung: 500 µm.

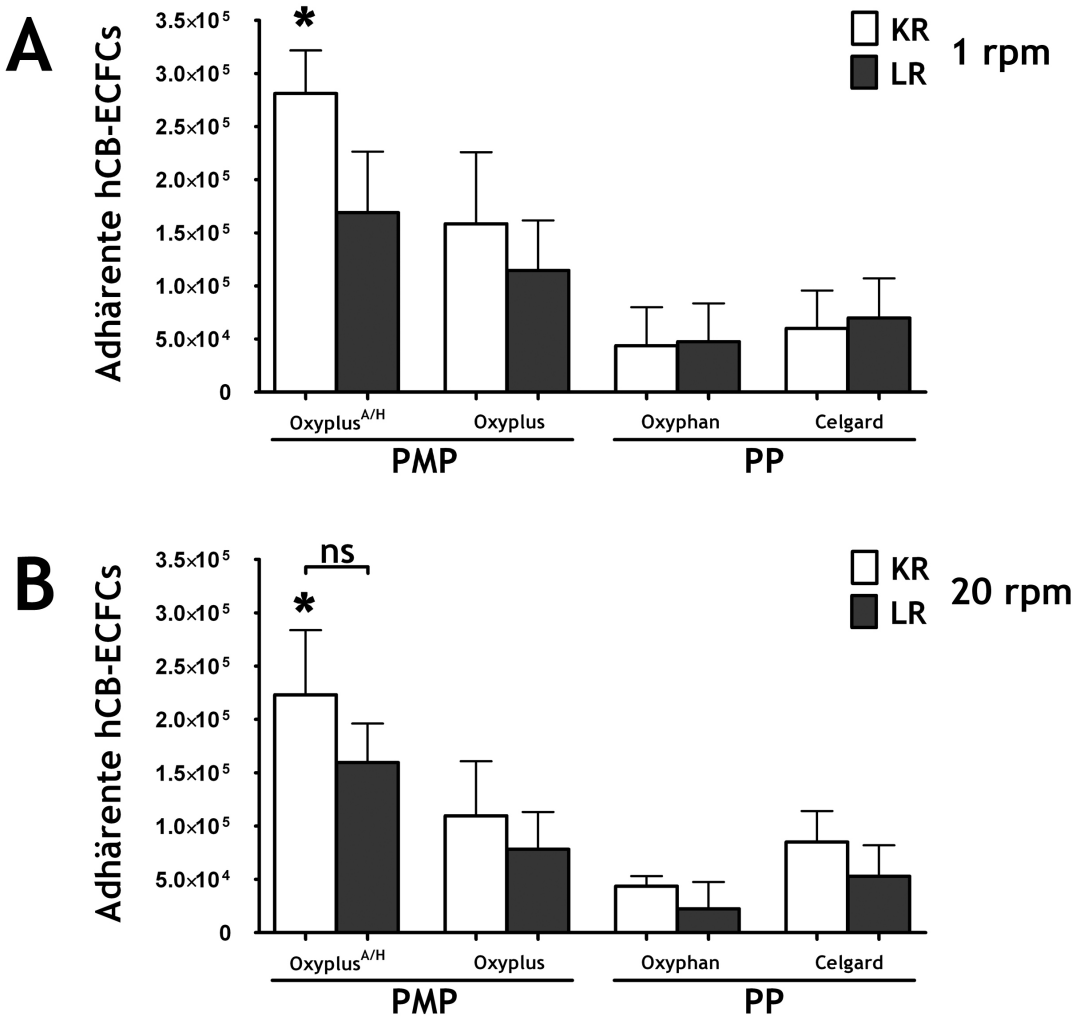


Abb. 18: Bestimmung der quantitativen Endothelialisierungseffizienz durch Zählung der adhärenten hCB-ECFCs (n = 6). Die Besiedlung der verschiedenen HFM-Typen erfolgte zuvor gemäß dem KR- bzw. LR-Kulturprotokoll mit einer initialen Rotationsgeschwindigkeit von 1 rpm (**A**) oder 20 rpm (**B**) über insgesamt sechs Tage. Die jeweils mit einem Stern markierte Kombination aus HFM-Typ und Kulturprotokoll weist gegenüber sämtlichen anderen Kombinationen, bei denen eine identische Rotationsgeschwindigkeit zum Einsatz kam, eine signifikant größere Zahl adhärenter Zellen auf ($p < 0{,}05$). Die einzige Ausnahme hiervon wurde gesondert als nicht signifikant (ns) markiert.

4.2.2 Qualitative Analyse der Zell- und der Proteinschicht auf Oxyplus$^{A/H}$-HFMs im Seitenvergleich

Initial erfolgte eine Endothelialisierung der Gasaustausch-HFMs mittels verschiedener Kulturprotokolle, um die am besten geeignete Kombination aus HFM-Typ und Besiedlungsverfahren zur Etablierung einer vitalen und möglichst konfluenten Zellschicht auf den HFM-Oberflächen zu identifizieren. Auf Grund der ersten Ergebnisse wurden zunächst Albumin / Heparin-beschichtetes PMP (Oxyplus$^{A/H}$) als signifikant bester HFM-Typ sowie das KR-Protokoll mit einer initialen Rotationsgeschwindigkeit von 1 rpm als Kulturprotokoll der Wahl ermittelt. Selbst bei dieser Kombination waren jedoch einzelne unbesiedelte Areale erkennbar (Abbildung 14), deren Verteilungsmuster nachfolgend näher untersucht und mit der Albumin / Heparin-Beschichtung der Oxyplus$^{A/H}$-HFMs verglichen wurde.

4.2.2.1 Analyse der endothelialen Zellschicht

Fluoreszenzmikroskopisch ließen sich regelhafte Unterschiede in der Ausprägung der endothelialien Zellschicht abhängig von der jeweiligen Ausrichtung des HFM-Patches im 15-mL-Probengefäß während der Rotationsphase feststellen: Die luminalen und lateralen Oberflächen der einzelnen Hohlfasern wiesen eine homogene und nahezu konfluente Besiedlung mit höchstens vereinzelten zellfreien Zonen auf (Abbildung 19 A). Demgegenüber fanden sich entlang der äußeren Hohlfaserscheitel, die während der Rotationsphase Kontakt mit der Wand der Probengefäße gehabt hatten (siehe hierzu Abbildung 7), ausgedehnte und überwiegend streifenförmige Bereiche ohne einen fluoreszenzmikroskopischen Hinweis auf adhärente und vitale hCB-ECFCs (Abbildung 19 B).

4.2.2.2 Analyse der Albumin / Heparin-Beschichtung

Beide Seiten der unbesiedelten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs wiesen vor Versuchsbeginn eine weitgehend uniforme Albumin / Heparin-Beschichtung auf, die teils von kleinen, unregelmäßigen Defekten durchsetzt war (Abbildung 20 C, D), welche dem Verteilungsmuster der hCB-ECFCs auf den Oberflächen der Hohlfasern (Abbildung 20 A) ähnelten. Nach Ablauf der 24-stündigen Rotationsphase in einem 15-mL-Probengefäß wurden wandseitig flächige Areale sichtbar, in denen die Beschichtung der HFMs nicht mehr angefärbt werden konnte (Abbildung 20 F). Auch diese Defektzonen zeigten morphologische Übereinstimmungen mit den zuvor wandseitig beobachteten, zellfreien Bereichen auf den Oberflächen der Oxyplus$^{A/H}$-HFMs (Abbildung 20 B). Die Integrität der luminalen Albumin / Heparin-Beschichtung blieb demgegenüber bis zum Ende des sechstägigen Kulturprotokolls unverändert (Abbildung 20 G); gleichermaßen konnten auch nach sechs Tagen Inkubationszeit noch wandseitige Defekte nachgewiesen werden (Abbildung 20 H).

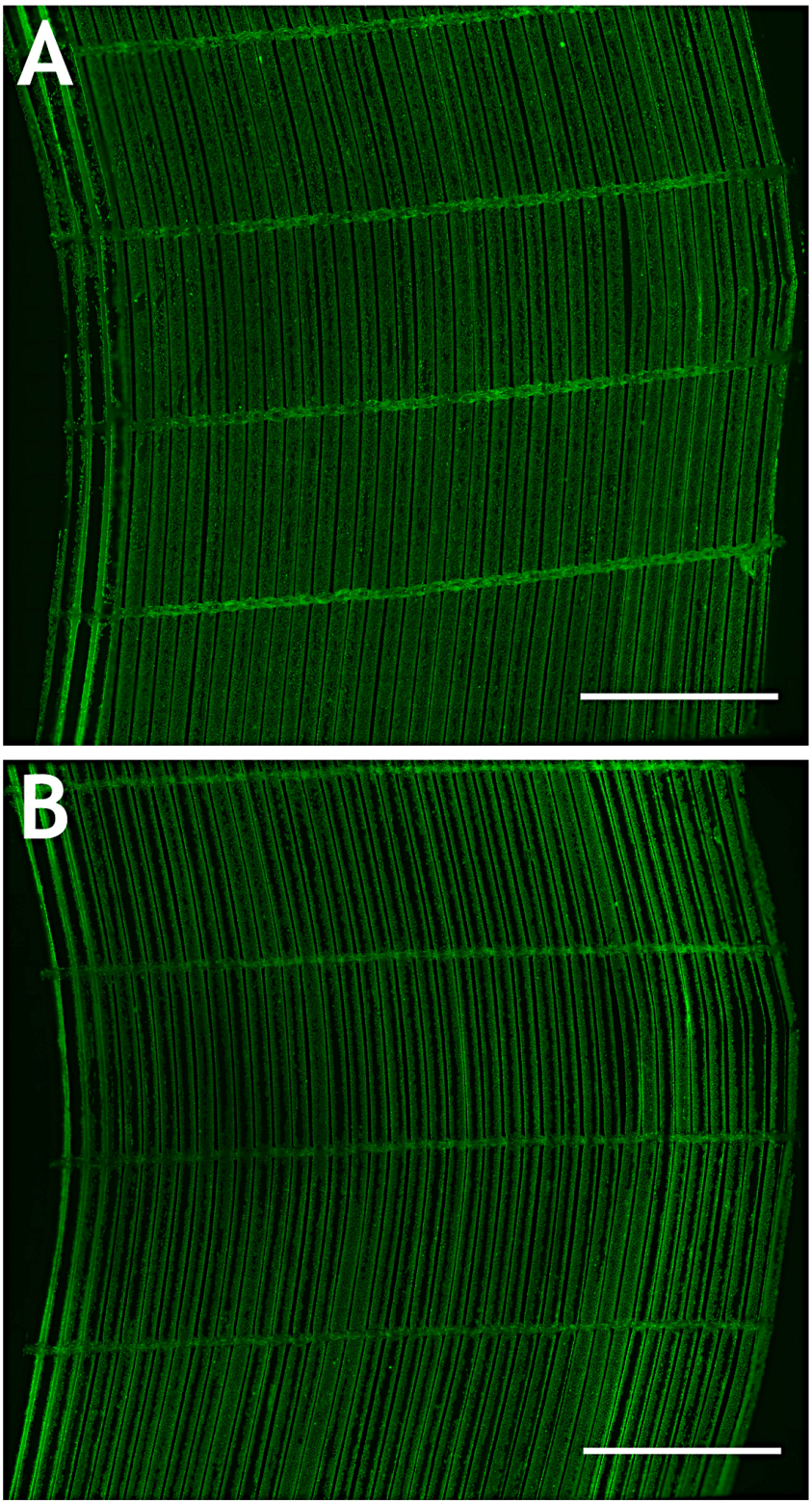


Abb. 19: Repräsentative Übersichtsaufnahme eines Oxyplus$^{A/H}$-Patches, der gemäß dem KR-Protokoll über sechs Tage mit hCB-ECFCs besiedelt wurde. Die luminale (**A**) und wandseitige (**B**) Zellschicht des selben HFM-Patches sind im Seitenvergleich abgebildet. Skalierung: 5 mm.

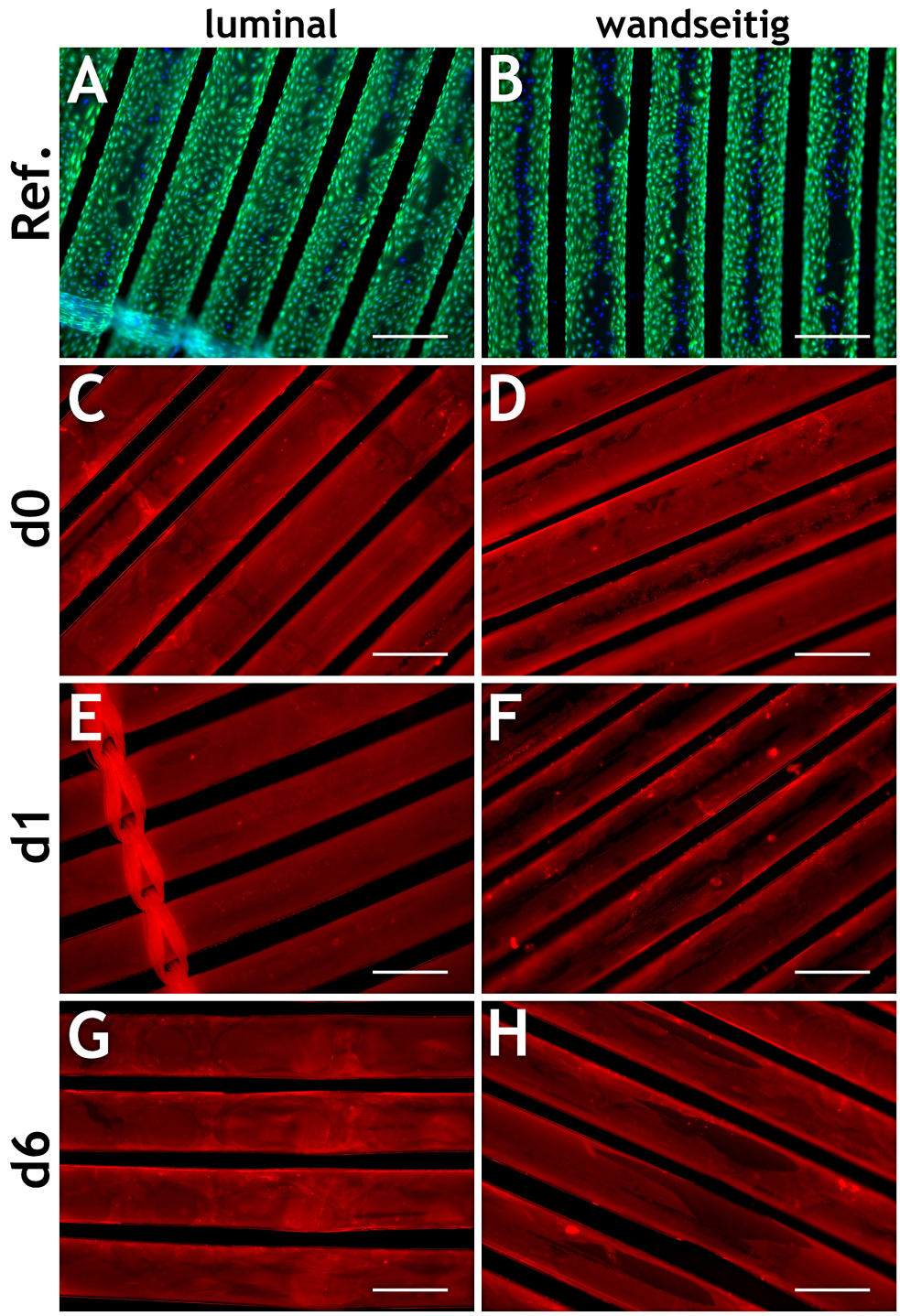


Abb. 20: Färbung der Albumin / Heparin-Beschichtung unbesiedelter Oxyplus$^{A/H}$-HFMs, die das KR-Protokoll in zellfreiem Medium durchliefen. Dargestellt ist der Zustand vor Beginn der Experimente (**C**, **D**), nach Ende der 24-stündigen Rotation im Probengefäß (**E**, **F**) und nach Ablauf der sechstägigen Gesamtzeit (**G**, **H**). Als Referenz (**Ref.**) sind zusätzlich unter identischen Bedingungen endothelialisierte Oxyplus$^{A/H}$-HFMs abgebildet (**A**, **B**). Skalierung: 500 µm.

4.2.3 Vergleich unterschiedlicher HFM-Typen nach Langzeit-Endothelialisierung über vier Wochen

Im Anschluss daran wurde – vor allem im Hinblick auf eine zukünftigen Langzeitanwendung endothelialisierter HFMs – die Möglichkeit untersucht, die unterschiedlichen Typen polymerer Gasaustausch-HFMs für einen Zeitraum von bis zu vier Wochen mit vitalen hCB-ECFCs zu besiedeln. Die qualitative, fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigte am 7. und 14. Tag keine Abweichungen von den zuvor durchgeführten Endothelialisierungsexperimenten über sechs Tage: Während die mit Albumin und Heparin vorbeschichteten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs beinahe konfluent mit vitalen Zellen bedeckt waren, ausgenommen lediglich schmale Streifen entlang der Hohlfaserscheitel, wiesen die unbeschichteten Oxyplus-HFMs erneut ein inkonstantes Besiedlungsmuster mit teils dicht besiedelten, teils ausgedehnten zellfreien Bereichen auf (Abbildung 21, A–D). Verglichen damit war auf den PP-Membrantypen Oxyphan und Celgard nur eine ausgesprochen geringe Zahl adhärenter und vitaler hCB-ECFCs sichtbar (Abbildung 22, A–D). Nach 21 und insbesondere nach 28 Tagen konnte auf sämtlichen HFM-Typen eine geringgradige Ausweitung der zellfreien Areale beobachtet werden (Abbildung 21, E–H, sowie Abbildung 22, E–H). Zur besseren Illustration sind vergrößerte Bildausschnitte exemplarisch für den Membrantyp Oxyplus$^{A/H}$ in Abbildung 23 zu finden, da dieser Prozess auf den zuvor nahezu konfluent besiedelten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs besonders deutlich zur Geltung kam. Ab dem 21. Tag zeigten sich außerdem erste Veränderungen in der Zellmorphologie, die auf den Oxyplus$^{A/H}$-HFMs ebenfalls am ausgeprägtesten sichtbar wurden: Obwohl die meisten Fasern nach wie vor mit kleinen, pflastersteinartigen Zellen bedeckt waren, nahmen einige hCB-ECFCs entlang der Hohlfaserscheitel an Größe zu, wobei sie sich auf die zuvor unbesiedelten Oberflächen auszubreiten schienen (Abbildung 23 C, D). Insgesamt lieferten die Albumin / Heparin-beschichteten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs das qualitativ beste Endothelialisierungsergebnis über den gesamten Kultivierungszeitraum.

Die ergänzende phasenkontrastmikroskopische Sichtung der im Rahmen des wöchentlichen Mediumwechsels verworfenen Zellkulturschalen führte bei allen untersuchten HFM-Typen zu einem ähnlichen Resultat: Trotz einer gewissen Anzahl nicht adhärenter und vermutlich abgestorbener Zellen im Mediumüberstand fand sich am Boden aller Kulturschalen nach sieben Tagen eine konfluente Einzelzellschicht mit pflastersteinartiger Morphologie – vergleichbar den hCB-ECFCs während der Routine-Zellkultur. Nach 14 Tagen ließen sich in den verworfenen Kulturschalen nur noch einzelne Zellcluster mit einer derartigen Gestalt finden, während die Anzahl der nicht adhärenten Zellen im Überstand unverändert erschien. Nach 21 und nach 28 Tagen waren phasenkontrastmikroskopisch keine adhärenten Zellen mit pflastersteinartiger Morphologie am Grund der Kulturschalen mehr erkennbar.

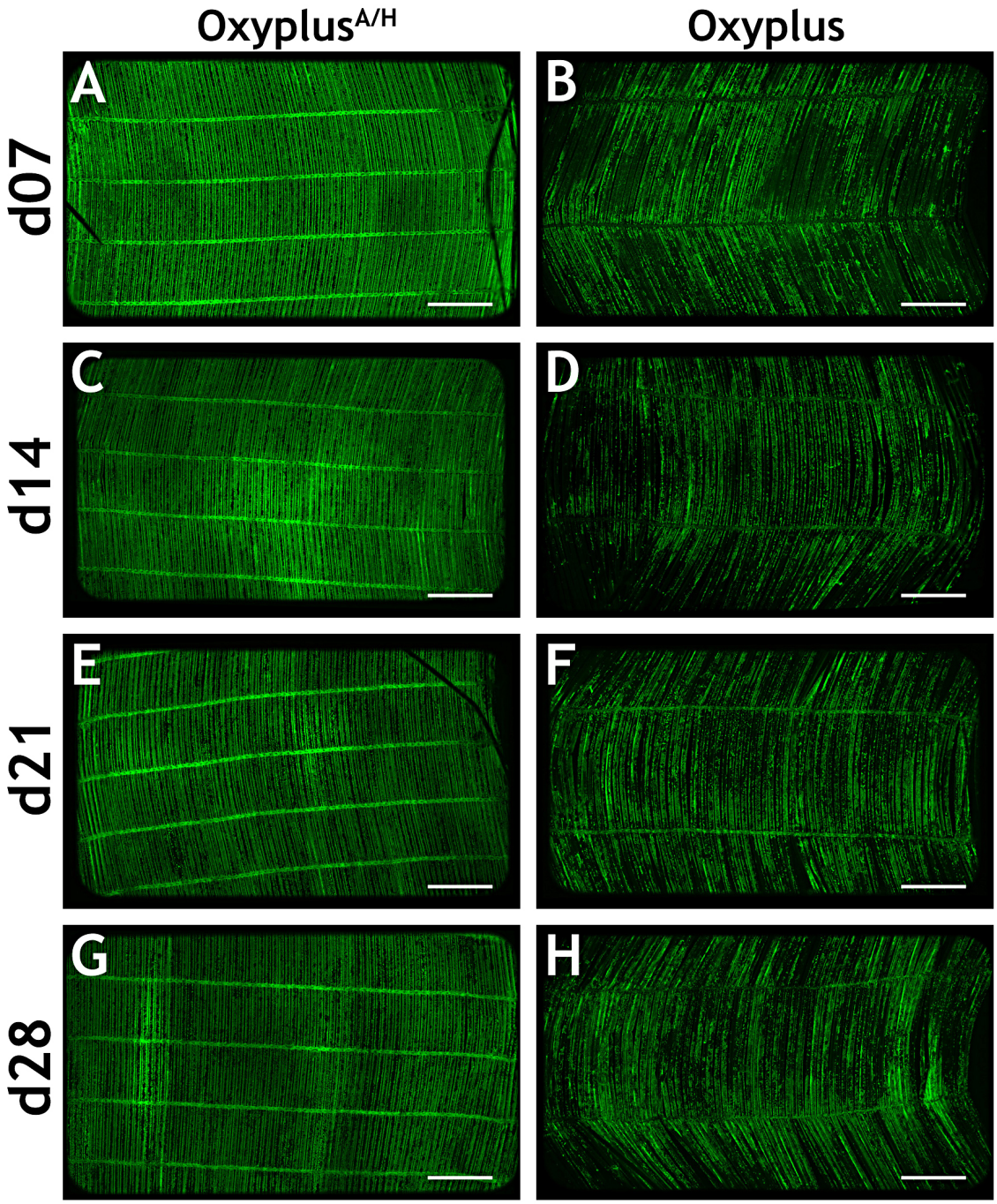


Abb. 21: Übersichtsaufnahmen von **PMP-HFMs**, auf denen hCB-ECFCs über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen kultiviert wurden. Die Endothelialisierung erfolgte unter Verwendung eines verlängerten KR-Protokolls mit 1 rpm initialer Rotationsgeschwindigkeit. Skalierung: 5 mm.

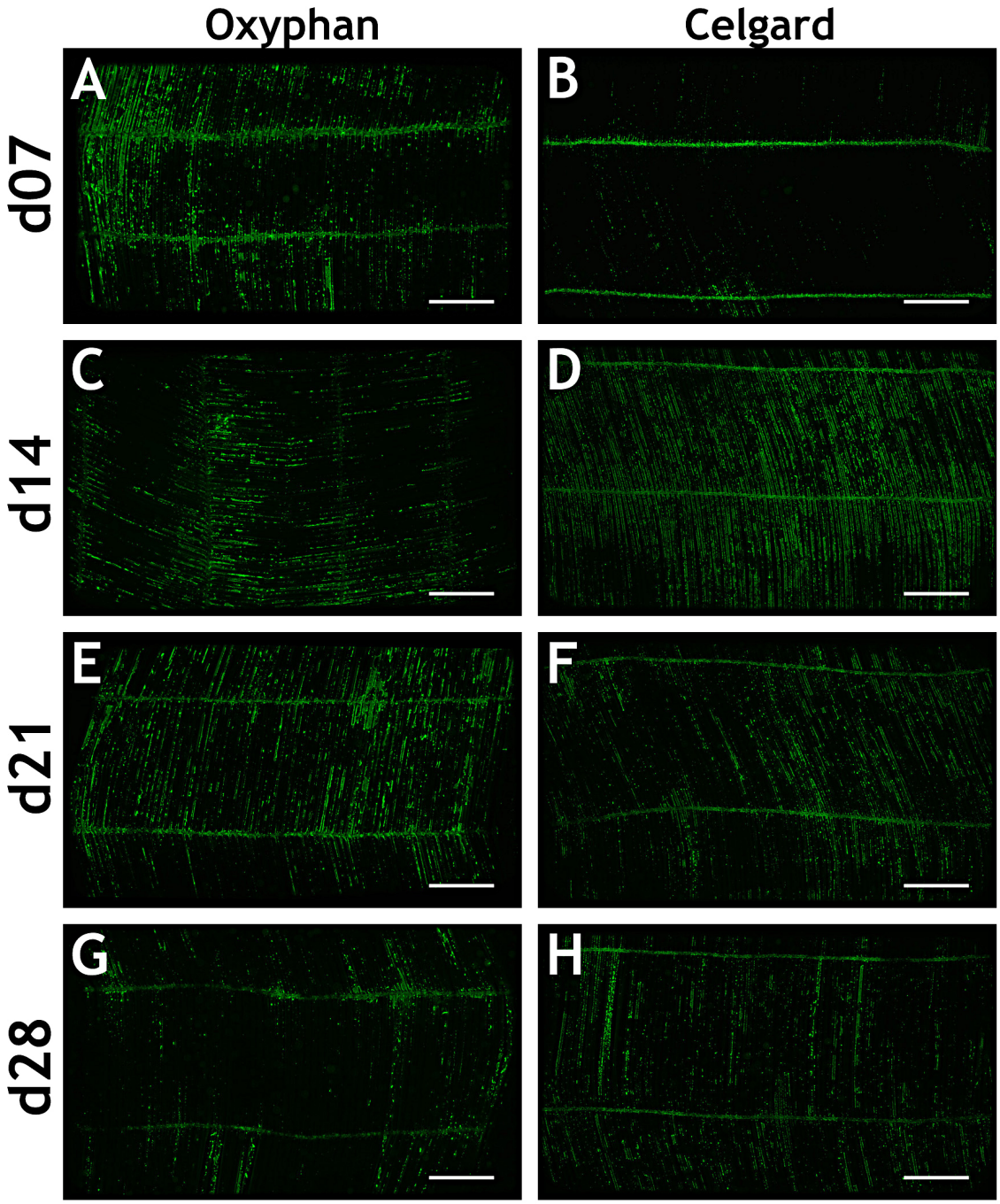


Abb. 22: Übersichtsaufnahmen von **PP-HFMs**, auf denen hCB-ECFCs über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen kultiviert wurden. Die Endothelialisierung erfolgte unter Verwendung eines verlängerten KR-Protokolls mit 1 rpm initialer Rotationsgeschwindigkeit. Skalierung: 5 mm.

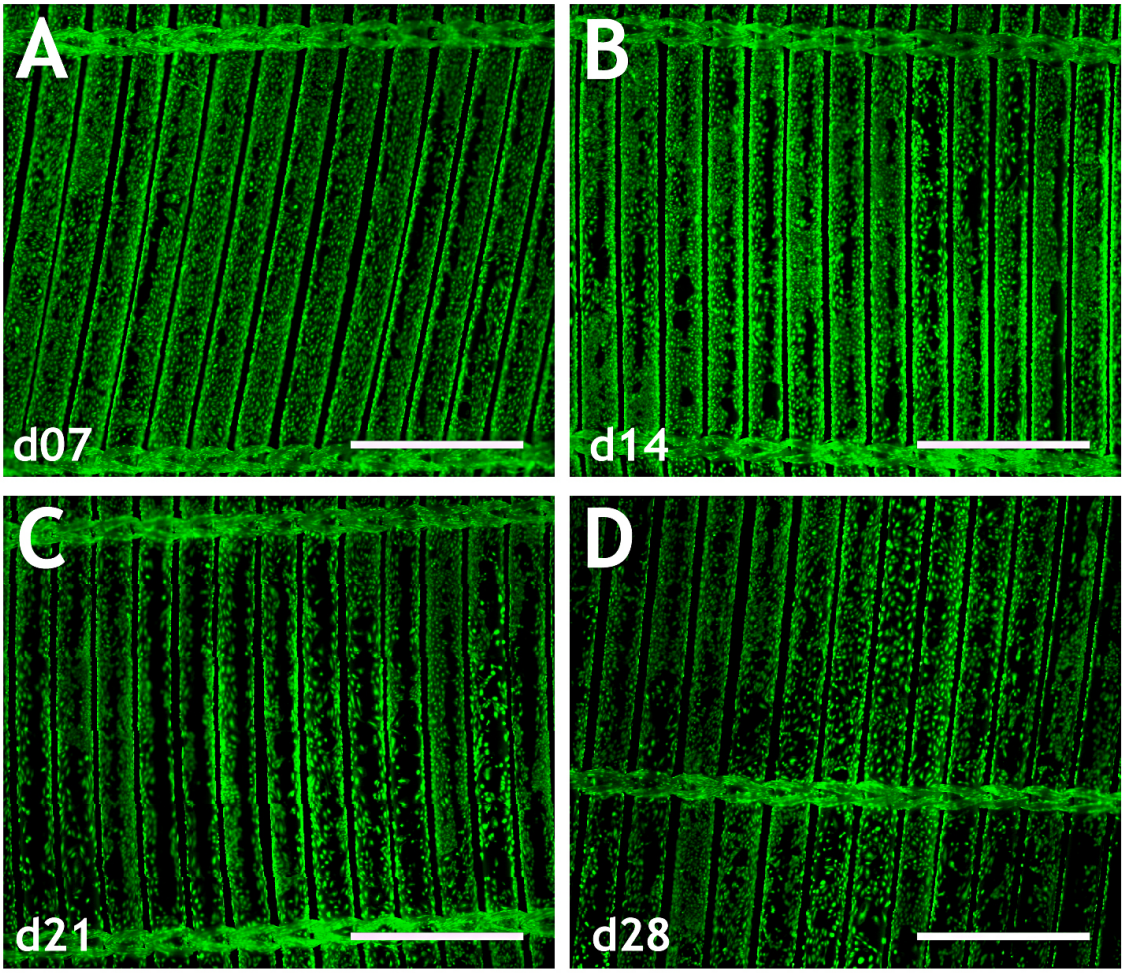


Abb. 23: Langzeit-Endothelialisierung von PMP-HFMs des Typs Oxyplus$^{A/H}$ in höherer Vergrößerung. Abgebildet sind repräsentative Membranausschnitte nach Ablauf eines Kultivierungszeitraumes von einer (**A**), zwei (**B**), drei (**C**) und vier Wochen (**D**). Skalierung: 2 mm.

In der quantitativen Analyse (Abbildung 24) konnte im direkten Vergleich des 28. Tages mit dem 7. Tag auf keinem der vier HFM-Typen eine statistisch signifikante Veränderung in der Zahl der adhärenten hCB-ECFCs beobachtet werden. Für die Oxyplus$^{A/H}$- und Oxyplus- sowie die Oxyphan-HFMs ließen sich aber Trends erkennen, die sich mit den mikroskopischen Beobachtungen deckten: Bis zum 14. Tag nahm die Zahl der adhärenten Zellen zunächst zu. Danach blieb sie weitgehend konstant (Oxyplus$^{A/H}$, Oxyphan) oder nahm ab (Oxyplus). Der ausgeprägteste Zellverlust trat bei den Oxyplus$^{A/H}$- und Oxyphan-HFMs zwischen der 3. und 4. Woche, bei den Oxyplus-HFMs dagegen bereits zwischen der 2. und 3. Woche auf. Demgegenüber sank die Zahl der adhärenten hCB-ECFCs auf den Celgard-HFMs kontinuierlich – im Gegensatz zur qualitativen Analyse, bei welcher die höchste Zelldichte ebenfalls nach 14 Tagen erreicht schien (Abbildung 22 D). Nach 28 Tagen bestand hinsichtlich der Zahl adhärenter Zellen keine statistisch signifikante Differenz zwischen den beiden PMP-Membrantypen Oxyplus$^{A/H}$ und Oxyplus

(Abbildung 24 A). Übereinstimmend mit den vorausgegangenen Experimenten bildete sich die bessere Endothelialisierbarkeit der PMP-HFMs jedoch auch nach 28 Tagen in einer signifikant höheren Zahl adhärenter hCB-ECFCs auf Oxyplus$^{A/H}$ im Vergleich mit den PP-Membrantypen Oxyphan und Celgard ab.

Zusätzlich gab eine Normalisierung der ermittelten Zellzahlen auf die jeweiligen Mantelflächen der HFM-Patches (Abbildung 24 B) Aufschluss darüber, dass eine Zelldichte von mindestens 2×10^4 hCB-ECFCs / cm^2 – vergleichbar mit konfluenten hCB-ECFCs während der Routine-Zellkultur – nur auf den PMP-HFMs erreicht wurde. In ihrer Zelldichte unterschieden sich beide PMP-Membrantypen nach 28 Tagen nicht signifikant von dem genannten Referenzwert. Dabei waren lediglich die beschichteten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs auf homogene Weise mit Zellen bedeckt (Abbildung 21 und 23); außerdem wiesen sie über

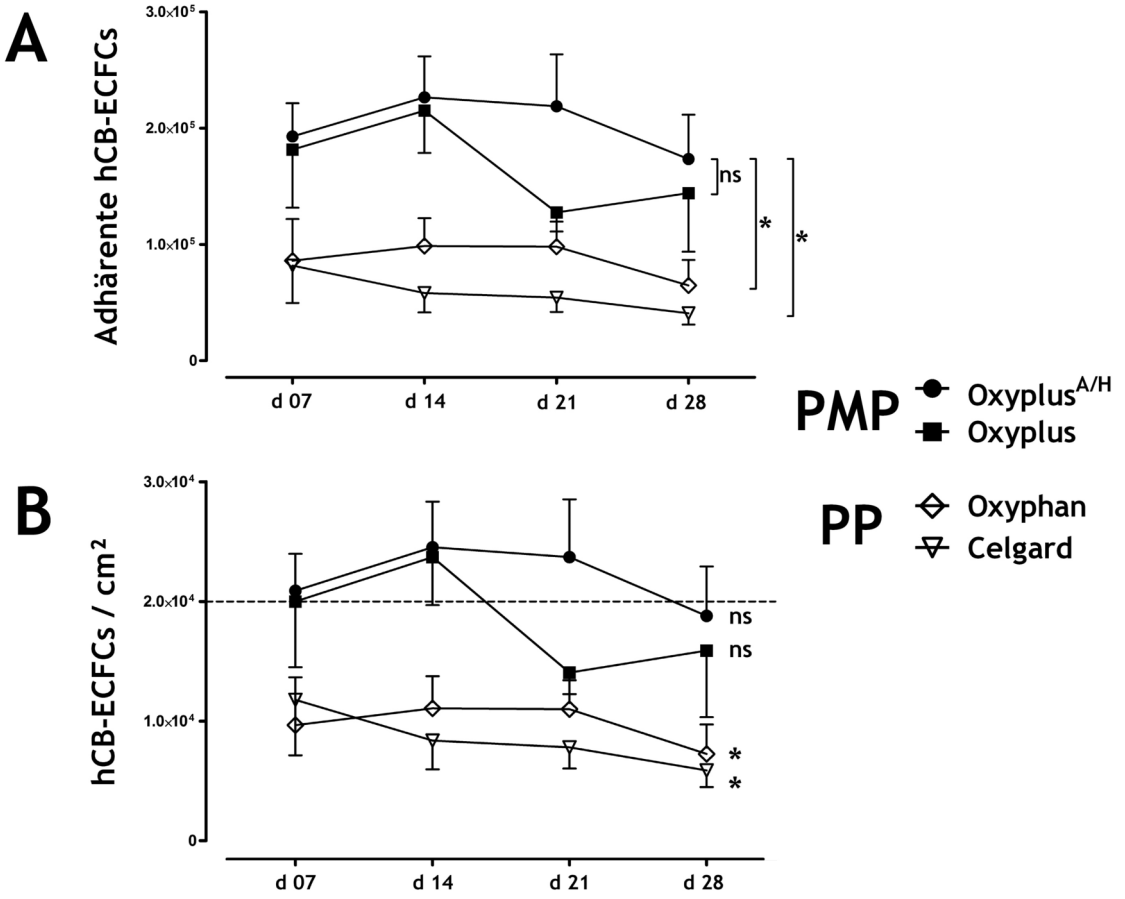


Abb. 24: Die adhärenten hCB-ECFCs wurden durch Zellzählung bestimmt (**A**) und rechnerisch auf die Mantelflächen der verwendeten HFMs normalisiert (**B**) (n = 6). Die unterbrochene Linie in B stellt als Referenz die minimale Zelldichte dar, welche durch eine konfluente Einzelzellschicht hCB-ECFCs währen der Routinekultur auf Gelatine-beschichtetem Zellkulturplastik erreicht wurde (2×10^4 hCB-ECFCs / cm^2). Statistisch signifikante Unterschiede der Zellzahl (A) bzw. Abweichungen der Zelldichte von diesem Referenzwert (B) wurden mit einem Stern markiert ($p < 0{,}05$); ns = nicht signifikant.

den gesamten Zeitraum die höchste Zahl adhärenter hCB-ECFCs auf (Abbildung 24). Die Zelldichte beider PP-HFMs lag während des Beobachtungszeitraumes dagegen stets signifikant unter 2×10^4 hCB-ECFCs / cm^2. Die Differenz in der absoluten Zahl adhärenter Zellen auf den beiden PP-Membrantypen Oxyphan und Celgard wurde durch die rechnerische Normalisierung auf die Mantelflächen der HFMs reduziert.

4.2.4 Analyse des Aktivierungszustandes der hCB-ECFCs nach Kultivierung auf polymeren HFMs

Die kombinierten Auswirkungen der als Substrat verwendeten HFMs und der Endothelialisierungs- bzw. Kulturbedingungen auf die zelluläre mRNA-Expression wurden mittels qPCR analysiert. Untersucht wurde neben typischen endothelialen Aktivierungsmarkern (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, TF, TM) auch die relative Expression scherstressresponsiver Faktoren (eNOS, KLF-2, ET-1). Es konnten dabei keine eindeutigen oder systematischen Veränderungen in der mRNA-Expression der untersuchten Marker nachgewiesen werden – ausgenommen KLF-2, dessen Transkripte im Vergleich mit unter statischen Routinebedingungen kultivierten hCB-ECFCs der siebten Passage stets in erhöhter Zahl vorlagen (Abbildung 25 und 26). Insgesamt wurden im direkten Vergleich mit dieser Referenzgruppe 41 signifikante Abweichungen der relativen Expression beobachtet, darunter 12 signifikant erhöhte und 29 signifikant verminderte mRNA-Transkriptlevel (für eine Übersicht siehe Tabelle 14). Jede der 16 untersuchten Kombinationen zeigte eine 1,5-fach ($Oxyplus^{A/H}$, LR-Protokoll, 20 rpm; Abbildung 26 B) bis 14,8-fach (Oxyplus, KR-Protokoll, 1 rpm; Abbildung 25 C) erhöhte Expression der KLF-2 – mRNA, sodass zehn

		mRNA-Transkriptlevel	
		Zunahme	Abnahme
Adhäsionsmarker	ICAM-1	0	4
	VCAM-1	1	4
	ELAM-1	0	2
Thrombogenitätsmarker	TF	1	2
	TM	0	7
Scherstressmarker	eNOS	0	4
	KLF-2	10	0
	ET-1	0	6
Σ		**12**	**29**

Tab. 14: Statistisch signifikante Abweichungen der relativen mRNA-Transkriptlevel von hCB-ECFCs nach sechstägiger Kultivierung auf polymeren HFMs gegenüber der Referenzgruppe. Alle signifikanten Abweichungen ($p < 0{,}05$) aus den Abbildungen 25 und 26 wurden in dieser Tabelle unabhängig von HFM-Typ oder Endothelialisierungsprotokoll zusammengefasst.

von insgesamt zwölf signifikanten Erhöhungen eines mRNA-Transkriptlevels auf KLF-2 zurückzuführen waren. Bedingt durch eine teils hohe Streuung der ermittelten Werte fiel diese Steigerung der KLF-2 – Transkription in einigen Fällen trotz einer deutlichen Tendenz aber nicht statistisch signifikant aus (Abbildung 25, A–D sowie F). Jeder andere Marker wies unter bestimmten Bedingungen eine signifikante Verminderung des jeweiligen mRNA-Transkriptlevels auf. Obwohl sich kein Muster finden ließ, das eine eindeutige Korrelation bestimmter mRNA-Expressionsprofile mit HFM-Typen oder Endothelialisierungsprotokollen erlaubte, zeichneten sich bei näherer Betrachtung einige Trends ab.

Lediglich in zwei Fällen zeigte einer der im Rahmen einer prothrombogenen, proinflammatorischen Endothelzell-Aktivierung induzierten Marker (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, TF) eine signifikante Zunahme des jeweiligen mRNA-Transkriptlevels: In hCB-ECFCs, die gemäß dem KR-Protokoll bei 1 rpm auf Oxyplus$^{A/H}$-HFMs kultiviert wurden (Abbildung 25 A), ließ sich gegenüber der Referenzgruppe eine 2,4-fache Zunahme der mRNA-Expression von TF nachweisen, welche schwach signifikant war ($p = 0{,}046$). Dies ist von besonderem Interesse, weil dieselbe Kombination aus HFM-Typ und Kulturprotokoll in allen vorausgehenden Experimenten die besten Ergebnisse hinsichtlich Adhäsion und Ausbildung einer konfluenten, vitalen Zellschicht aufgewiesen hatte. Es konnten neben dieser moderaten Induktion der TF – mRNA jedoch keine weiteren signifikanten Abweichungen von der Referenzgruppe gefunden werden. Daneben führte eine Endothelialisierung von Oxyplus$^{A/H}$-HFMs mit dem KR-Protokoll bei 20 rpm (Abbildung 26 A) zu einer 4,8-fach gesteigerten Expression der VCAM-1 – mRNA ($p = 0{,}029$).

Sechs der insgesamt 29 signifikant verminderten mRNA-Transkriptlevel wurden im Rahmen von Experimenten beobachtet, bei denen die Endothelialisierung mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 1 rpm durchgeführt wurde (Abbildung 25 B, D, E, F), die übrigen 23 dagegen bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 20 rpm (Abbildung 26, A–H). Ein Rückgang in der mRNA-Expression der Adhäsionsfaktoren ICAM-1 und VCAM-1 trat insbesondere beim LR-Protokoll mit 20 rpm auf. Die Transkription beider Marker fiel auf den PMP-HFMs signifikant geringer aus als die der Referenzgruppe (Abbildung 26 B, D), während auf den PP-HFMs nur jeweils einer der Marker eine signifikante Abnahme des jeweiligen mRNA-Transkriptlevels zeigte (Abbildung 26 F, H). Eine ähnlich ausgeprägte Tendenz schien sich auch für die ICAM-1 – und VCAM-1 – mRNA nach Anwendung des LR-Protokolls mit 1 rpm abzuzeichnen (Abbildung 25 B, D, F, H), obwohl die Unterschiede zur Referenzgruppe hier zum überwiegenden Teil nicht signifikant waren. Die signifikante Verminderung der Expression von TM, eNOS und ET-1 zeigte keine vergleichbare Relation mit bestimmten Kulturprotokollen oder Rotationsgeschwindigkeiten; erneut traten aber die meisten Abweichungen bei 20 rpm auf (14 von 17 signifikant verminderten mRNA-Transkriptleveln). Die mRNA-Expression von ELAM-1 und TF war insgesamt am seltensten von signifikanten Veränderungen betroffen.

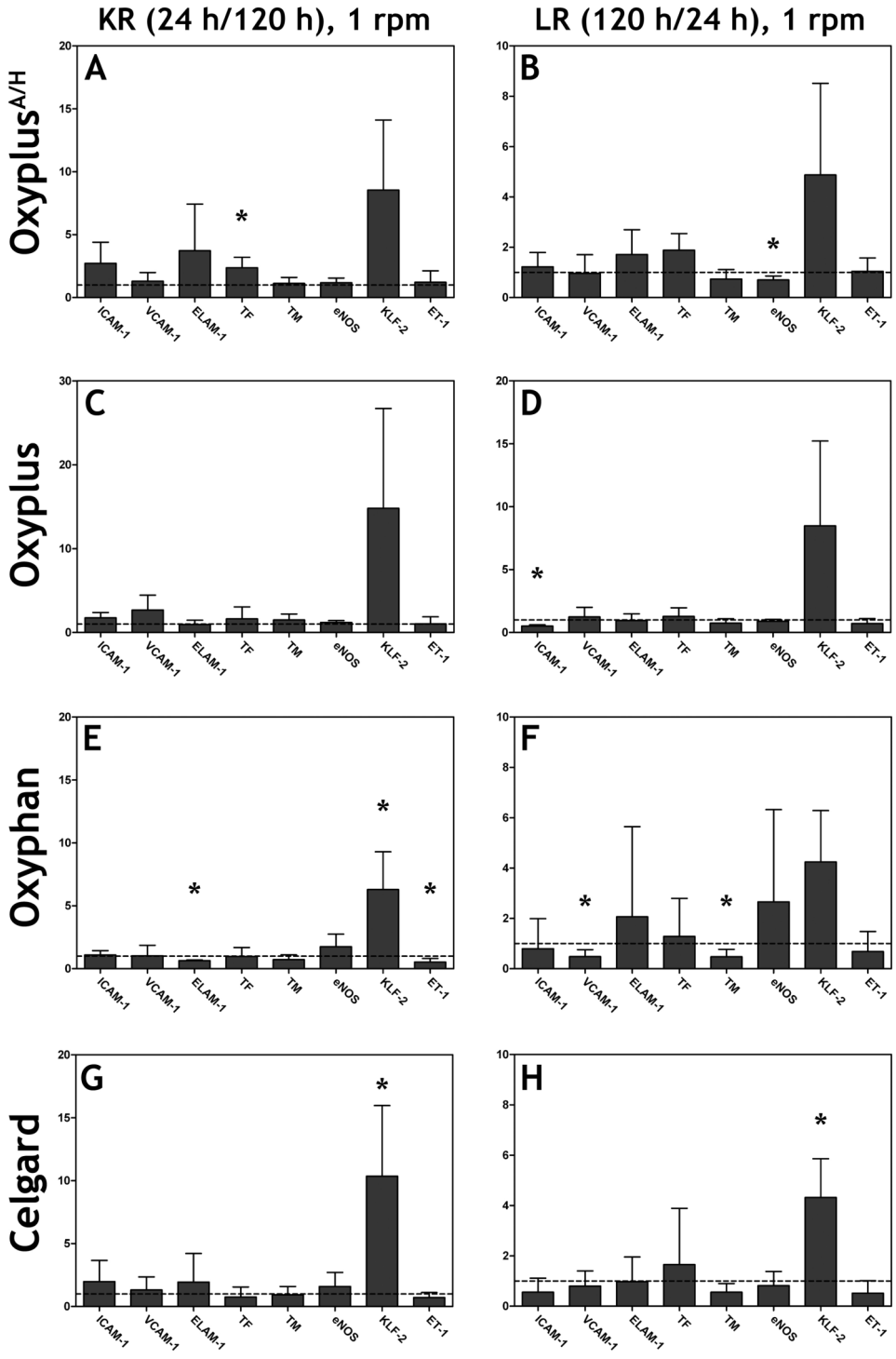


Abb. 25: Relative mRNA-Transkriptlevel von hCB-ECFCs, die über sechs Tage auf polymeren HFMs kultiviert wurden. Die Analyse erfolgte mittels semiquantitativer *realtime*-PCR (n = 4). Beide Endothelialisierungsprotokolle (KR = kurze Rotationszeit, LR = lange Rotationszeit) wurden mit **1 rpm** initialer Rotationsgeschwindigkeit angewendet. Die unterbrochenen Linien kennzeichnen einen relativen Expressionswert von 1,0 (entsprechend der mRNA-Expression der Referenzgruppe). Alle statistisch signifikanten Abweichungen von diesem Wert wurden mit einem Stern markiert ($p < 0{,}05$).

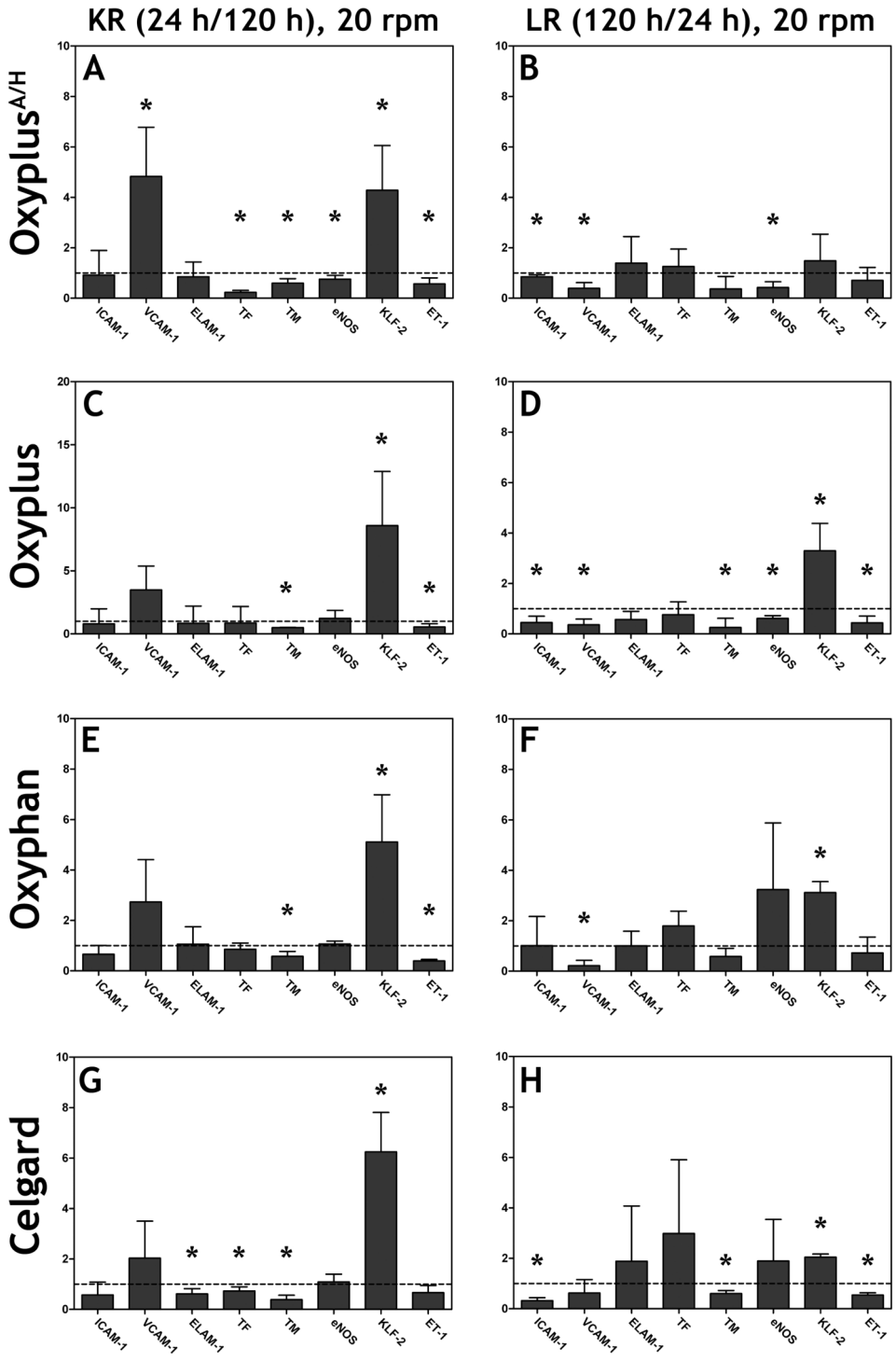


Abb. 26: Relative mRNA-Transkriptlevel von hCB-ECFCs, die über sechs Tage auf polymeren HFMs kultiviert wurden. Die Analyse erfolgte mittels semiquantitativer *realtime*-PCR (n = 4). Beide Endothelialisierungsprotokolle (KR = kurze Rotationszeit, LR = lange Rotationszeit) wurden mit **20 rpm** initialer Rotationsgeschwindigkeit angewendet. Die unterbrochenen Linien kennzeichnen einen relativen Expressionswert von 1,0 (entsprechend der mRNA-Expression der Referenzgruppe). Alle statistisch signifikanten Abweichungen von diesem Wert wurden mit einem Stern markiert ($p < 0{,}05$).

4.2.5 Analyse der proinflammatorischen Aktivierbarkeit der hCB-ECFCs nach Kultivierung auf PMP-HFMs

Nach sechsstündiger Stimulation der endothelialisierten PMP-Membranpatches vom Typ Oxyplus$^{A/H}$ bzw. Oxyplus mit rhuTNF-α konnte auf mRNA-Ebene eine signifikante Induktion aller proadhäsiven Aktivierungsmarker beobachtet werden. ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 zeigten einen bis zu 372,8-fachen Anstieg (ELAM-1 auf Oxyplus$^{A/H}$; Ab-

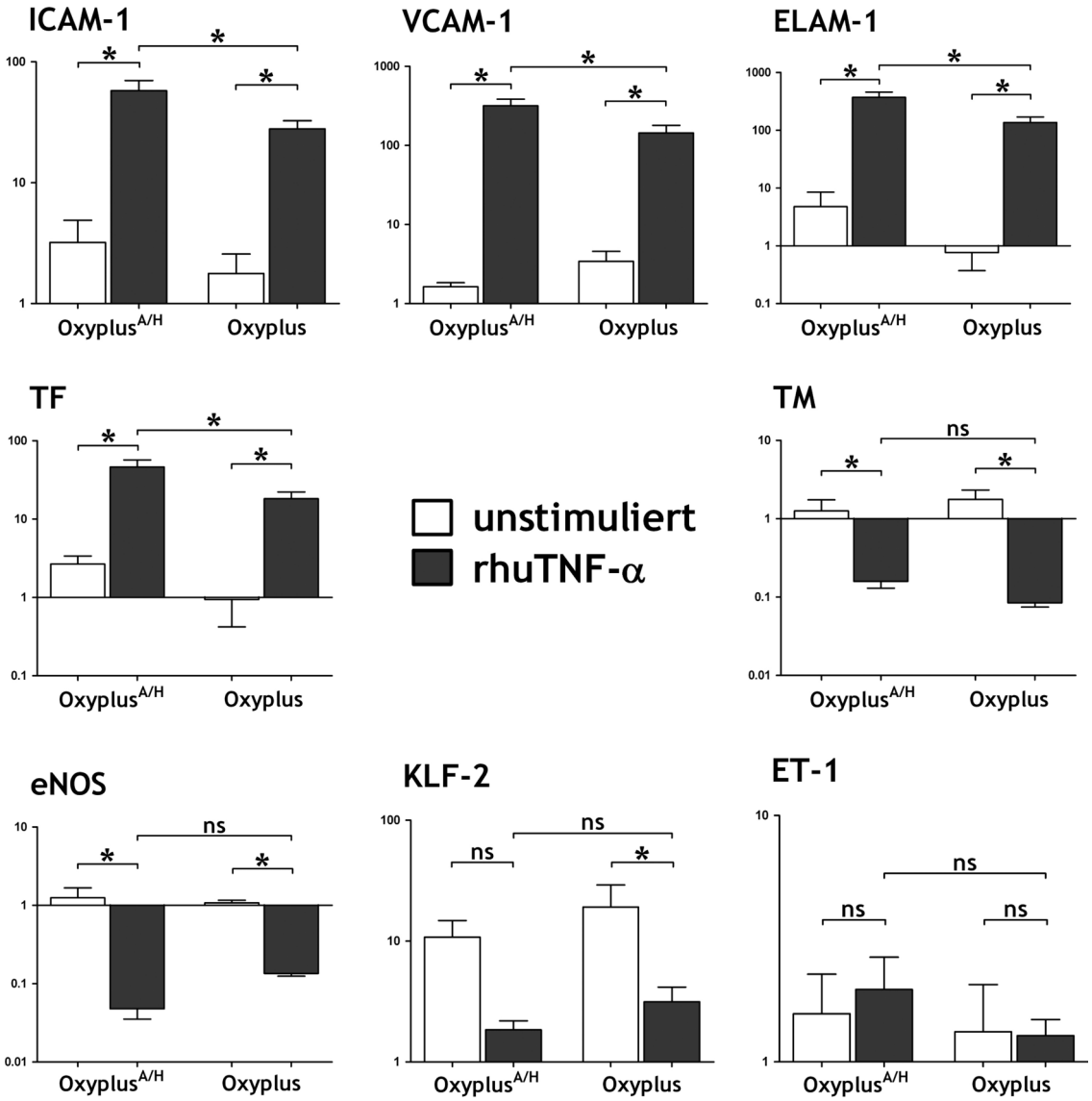


Abb. 27: Die Aktivierbarkeit von hCB-ECFCs, die zuvor gemäß dem KR-Protokoll (1 rpm) über sechs Tage auf PMP-HFMs kultiviert wurden, wurde durch Stimulation der endothelialisierten HFM-Patches mit rhuTNF-α und anschließende semiquantitative *realtime*-PCR analysiert (n = 3). Statistisch signifikante Unterschiede der relativen mRNA-Expressionswerte wurden mit einem Stern markiert ($p < 0{,}05$); ns = nicht signifikant.

bildung 27) des relativen mRNA-Transkriptlevels. Eine statistisch signifikante Differenz konnte jedoch nicht nur zwischen den relativen Expressionswerten stimulierter und unstimulierter hCB-ECFCs auf dem jeweils identischen Membrantyp festgestellt werden, sondern auch bei einem Vergleich der stimulierten Zellpopulationen auf den beiden unterschiedlichen Typen von PMP-HFMs. Dabei wurden auf den mit Albumin und Heparin beschichteten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs stets signifikant höhere relative Expressionswerte als auf den unbeschichteten Oxyplus-HFMs gemessen. Der prothrombogene Aktivierungsmarker TF wies nach erfolgter Stimulation ein gleichartiges Induktionsmuster mit einer 46,2-fach (Oxyplus$^{A/H}$) bzw. 18,2-fach (Oxyplus) gesteigerten mRNA-Expression auf.

Im Gegensatz dazu wurden die antithrombogenen Marker TM und eNOS nach der inflammatorischen Stimulation mit rhuTNF-α auf beiden PMP-Membrantypen in einem signifikant geringeren Ausmaß exprimiert als durch unstimulierte hCB-ECFCs auf dem jeweils identischen HFM-Typ (Abbildung 27). Ein signifikanter Unterschied zwischen den stimulierten Zellpopulationen auf Oxyplus$^{A/H}$ und Oxyplus ließ sich für TM und eNOS aber – anders als bei den proadhäsiven bzw. prothrombogenen Markern – nicht beobachten. Des Weiteren fand sich eine statistisch signifikante Abnahme des mRNA-Transkriptlevels von KLF-2 nach proinflammatorischer Stimulation nur auf den unbeschichteten Oxyplus-HFMs, obwohl auch auf den beschichteten HFMs des Typs Oxyplus$^{A/H}$ ein ähnlicher Trend sichtbar wurde. Die Expression von ET-1 wurde durch eine Stimulation der endothelialisierten HFM-Patches mit rhuTNF-α insgesamt nicht signifikant beeinflusst. Auch konnte bei keinem der untersuchten Marker eine signifikante Differenz des mRNA-Transkriptlevels unstimulierter Zellen auf Oxyplus$^{A/H}$ im Vergleich mit unstimulierten Zellen auf Oxyplus beobachtet werden.

4.3 Zwischenfazit

Die bis zu diesem Punkt durchgeführten Endothelialisierungsexperimente zeigten, dass von allen untersuchten Membrantypen nur die mit Albumin und Heparin vorbeschichteten PMP-HFMs des Typs Oxyplus$^{A/H}$ eine homogene Endothelialisierung mit Ausbildung einer nahezu konfluenten sowie vitalen Zellschicht auf der Oberfläche der Hohlfasern ermöglichten. Allerdings wiesen selbst die Oxyplus$^{A/H}$-HFMs einige zellfreie Areale auf, die im Bereich der äußeren Hohlfaserscheitel besonders ausgeprägt waren und dort mit den Kontaktflächen der Hohlfasern zur Innenwand der bei der Endothelialisierung eingesetzten Probengefäße korrespondierten. Das KR-Protokoll mit einer initialen Rotationsgeschwindigkeit von 1 rpm führte zur höchsten Zahl adhärenter hCB-ECFCs auf Oxyplus$^{A/H}$, wobei nur die Rotationsdauer (nicht jedoch die Rotationsgeschwindigkeit) einen signifikanten Einfluss auf die Zahl der adhärenten Zellen hatte. Da auch im Langzeitversuch über vier Wochen die meisten adhärenten und vitalen hCB-ECFCs auf den HFMs des Typs Oxyplus$^{A/H}$ beobachtet werden konnten, stellte sich diese Kombination aus HFM-Typ und

Besiedlungsprotokoll als am besten geeignet für nachfolgende Experimente dar. Molekularbiologisch ließ sich nach Abschluss der sechstägigen Endothelialisierungszeit zwar eine schwache, wenn auch signifikante Zunahme des mRNA-Transkriptlevels von TF beobachten; diese stand jedoch in keinem Verhältnis zur Reaktion der hCB-ECFCs auf eine proinflammatorische Stimulation mit rhuTNF-α (2,4-facher gegenüber 46,2-fachem Anstieg der relativen mRNA-Expression). Deshalb erfolgten trotz der geringfügigen Einschränkungen alle konsekutiv durchgeführten Flussexpositionsversuche mit Oxyplus$^{A/H}$-HFMs, die gemäß dem KR-Protokoll mit einer initialen Rotationsgeschwindigkeit von 1 rpm endothelialisiert wurden (Abbildung 28).

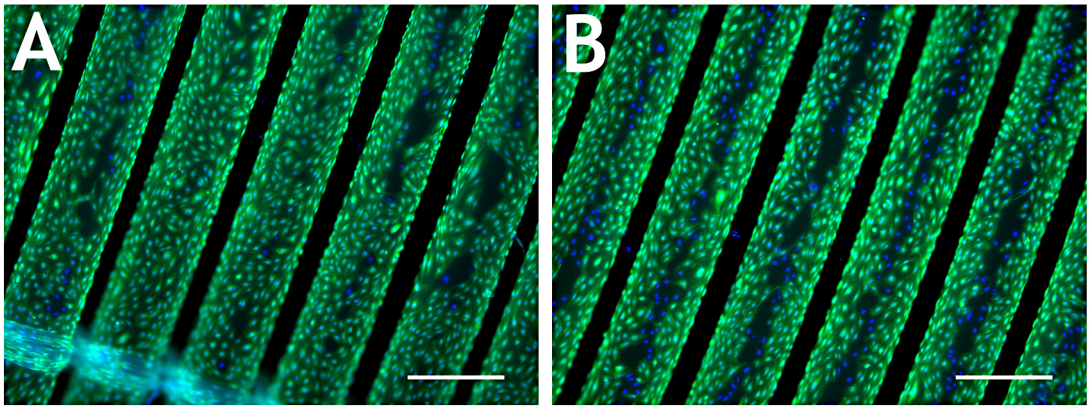


Abb. 28: Repräsentative Abbildungen von Oxyplus$^{A/H}$-HFMs, die gemäß dem KR-Protokoll bei 1 rpm endothelialisiert und als Referenzmembranen für die konsekutiven Flussexpositionsversuche verwendet wurden. Skalierung: 500 µm.

4.4 Flussexposition endothelialisierter Oxyplus$^{A/H}$-HFMs

4.4.1 Adhäsion der hCB-ECFCs nach Flussexposition

Fluoreszenzmikroskopisch ließ sich unabhängig vom jeweils einwirkenden Volumenfluss bereits nach sechs Stunden eine Vergrößerung der zellfreien Areale entlang der Hohlfaserscheitel ausmachen (Abbildung 29 A, C, E sowie Abbildung 30 A, C, E), wobei keine qualitativen Unterschiede zwischen den Vorder- und Rückseiten der exponierten HFM-Patchflächen sichtbar waren. Kernartige DNA-Rückstände zeigten sich vor allem in den Grenzzonen vitaler Zellen und zellfreier Bereiche. Durch die TAMRA-Färbung konnte hier zumeist ein schwach anfärbbarer Proteinsaum identifiziert werden (Abbildung 29 E sowie Abbildung 30 E), wohingegen keine Calcein-Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Entlang der lateralen Hohlfaser-Oberflächen blieb die endotheliale Zellschicht weitgehend intakt; ebenso an den Verbindungsfäden, welche die einzelnen Hohlfasern miteinander verknüpften (Abbildung 29 A). Weiterhin wiesen die adhärenten hCB-ECFCs nach Flussexposition eine eher spindelförmige Morphologie auf, wobei eine beginnende Ausrichtung

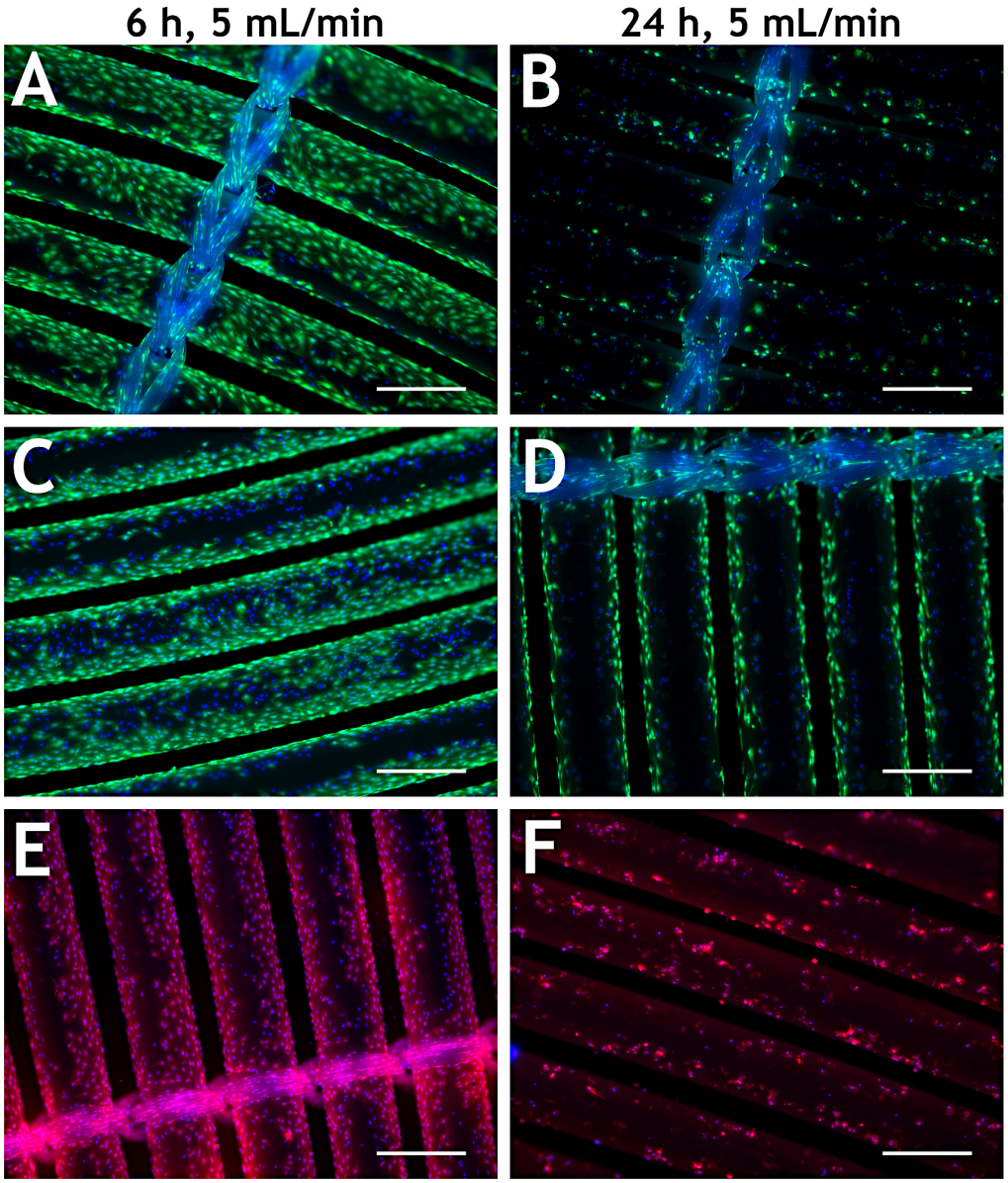


Abb. 29: Repräsentative Aufnahmen von besiedelten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs, die nach Abschluss der sechstägigen Endothelialisierung über 6 h (**A**, **C**, **E**) bzw. 24 h (**B**, **D**, **F**) einem Fluss von **5 mL/min** ausgesetzt wurden. Färbung: Hoechst 33342 und Calcein-AM (A – D) bzw. TAMRA (E, F). Skalierung: 500 µm.

der longitudinalen Zellachsen in eine gemeinsame Richtung zu erfolgen schien (Abbildung 29 A sowie geringer auch in Abbildung 30 C).

Demgegenüber wurde nach 24-stündiger Flussexposition – wiederum sowohl bei schwachem (Abbildung 29 B, D, F) als auch starkem (Abbildung 30 B, D, F) Volumenfluss – ein massiver Zellverlust über die gesamte Oberfläche der HFM-Patches beobachtet. Die wenigen vitalen hCB-ECFCs, die fluoreszenzmikroskopisch noch nachgewiesen werden konnten, schienen sich überwiegend von den Verbindungsfäden aus entlang der lateralen

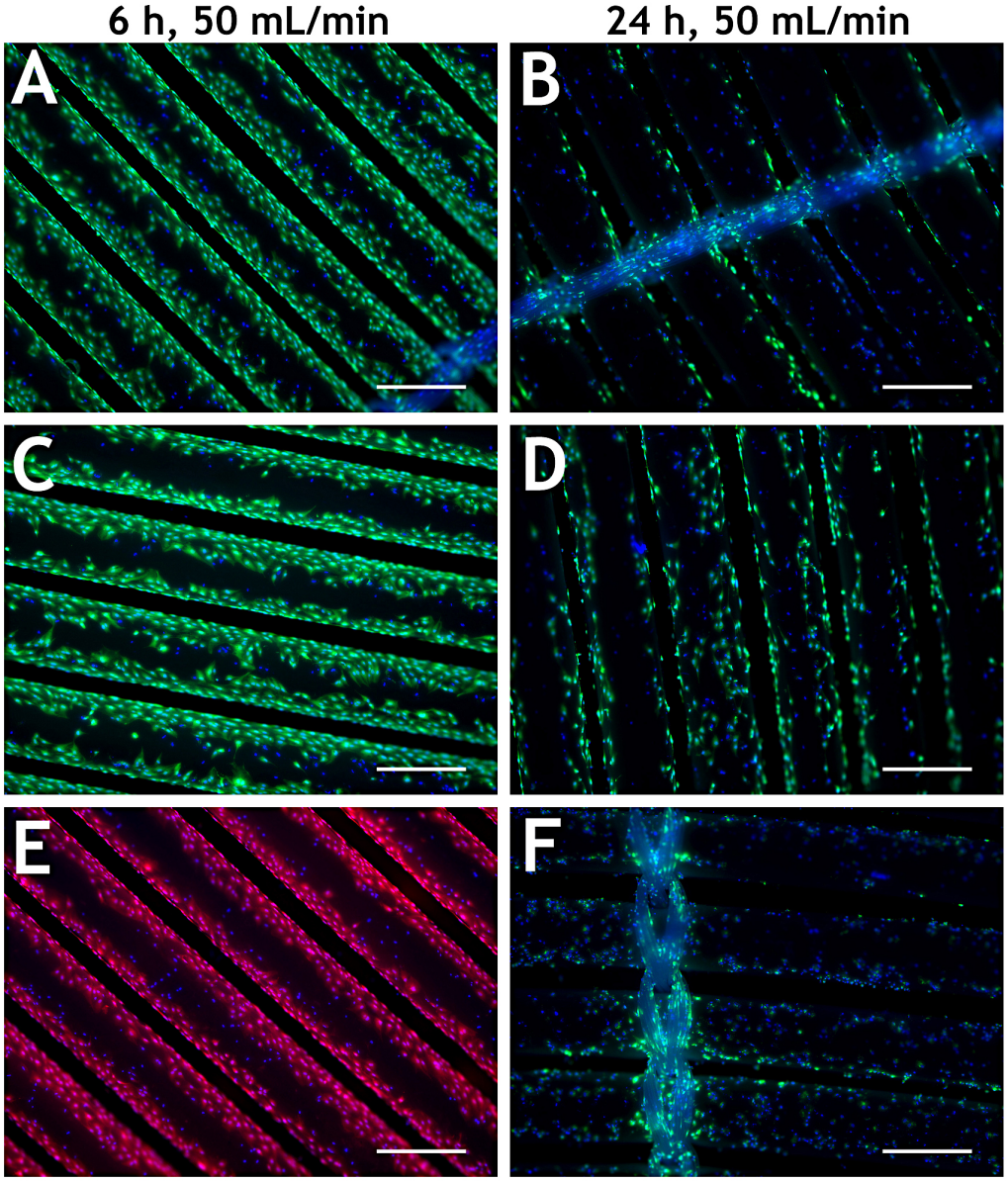


Abb. 30: Repräsentative Aufnahmen von besiedelten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs, die nach Abschluss der sechstägigen Endothelialisierung über 6 h (**A**, **C**, **E**) bzw. 24 h (**B**, **D**, **F**) einem Fluss von **50 mL/min** ausgesetzt wurden. Färbung: Hoechst 33342 und Calcein-AM (A – D, F) bzw. TAMRA (E). Skalierung: 500 µm.

Hohlfaser-Oberflächen zu erstrecken (Abbildung 29 D), waren mitunter jedoch auch ohne ein erkennbares Muster verteilt (Abbildung 30 D). An den Eckpunkten der hexagonalen Patchexpositionsflächen fiel die Zelladhäsion in einigen Fällen etwas besser aus, wohingegen sich in den übrigen Patchabschnitten vielfach Areale zeigten, die neben vereinzelten hCB-ECFCs lediglich kernartige DNA-Rückstände in einer zufälligen Verteilung aufwiesen (Abbildung 30 F). Diese Rückstände waren erneut von einem schwach TAMRA-positiven Saum umgeben (Abbildung 29 F).

Durch die zusätzliche relative Quantifizierung wurde bei allen untersuchten Versuchskonstellationen eine signifikante Abnahme der Zahl adhärenter Zellen gegenüber dem Referenzzustand vor Beginn der Flussexposition beobachtet (Abbildung 31). Während nach sechsstündiger Expositionszeit noch ca. 60% der hCB-ECFCs erhalten blieben, betrug dieser Wert nach 24 Stunden nur noch ca. 10%. Ein signifikanter Unterschied zwischen einem schwachen Volumenfluss von 5 mL/min und einem stärkeren Volumenfluss von 50 mL/min ließ sich bei identischer Expositionszeit nicht feststellen. Bei identischen Flussbedingungen kam es dagegen aber zu einer signifikanten Abnahme der Zahl adhärenter hCB-ECFCs in Abhängigkeit von der Expositionsdauer. Insgesamt stimmten die Ergebnisse der quantitativen Analyse mit der qualitativen, mikroskopischen Evaluation überein und stützten den Verdacht eines zeitabhängigen, jedoch flussunabhängigen Zellverlustes innerhalb des experimentell untersuchten Rahmens.

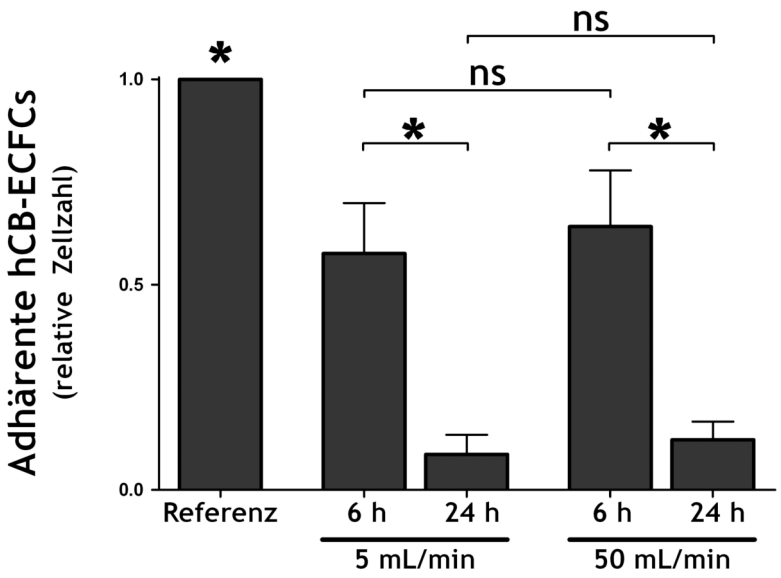


Abb. 31: Relative Quantifizierung der adhärenten hCB-ECFCs nach Flussexposition. Die Auswertung erfolgte durch Zählung der adhärenten Zellen (n = 6) und rechnerische Normalisierung auf die Zahl der adhärenten hCB-ECFCs am Ende der sechstägigen Endothelialisierungsphase (Referenz). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Stern markiert ($p < 0{,}05$); ns = nicht signifikant. Die ebenfalls mit einem Stern markierte Referenzgruppe weist eine signifikant höhere Zellzahl als jede der vier Versuchsgruppen auf.

4.4.2 Zelluläre mRNA-Expression nach Flussexposition

Nach sechsstündiger Flussexposition erfolgte eine sofortige Lyse der noch adhärenten Zellen. Die Ergebnisse der anschließend durchgeführten qPCR (Abbildung 32) zeigten eine flussabhängige Zunahme der relativen mRNA-Expression von ICAM-1, die jedoch erst bei höherem Fluss (50 mL/min) ein signifikantes Niveau im Vergleich mit der nicht flussexponierten Referenzgruppe erreichte. Demgegenüber wurde VCAM-1 trotz einer dezenten,

scheinbar flussunabhängigen Abnahme des mRNA-Transkriptlevels nicht signifikant beeinflusst. Die übrigen Aktivierungsmarker ELAM-1 und TF reagierten beide in ähnlicher Weise auf die Flussexposition: Bei einem geringen Volumenfluss von 5 mL/min war eine signifikante Zunahme des jeweiligen Transkriptlevels erkennbar, welche sich bei Erhöhung des Volumenflusses wieder rückläufig darstellte. Während die relative Expression der ELAM-1 – mRNA sich bei einem gesteigerten Fluss von 50 mL/min jedoch nicht mehr signifikant von der nicht flussexponierten Referenzgruppe unterschied, blieb die relative Expression der TF – mRNA auch bei 50 mL/min noch signifikant erhöht. Im Kontext der vorausgegangenen Experimente (siehe Abschnitt 4.2.4) ist außerdem die deutlich unter 1,0 liegende TF-Expression der Referenzgruppe auffällig.

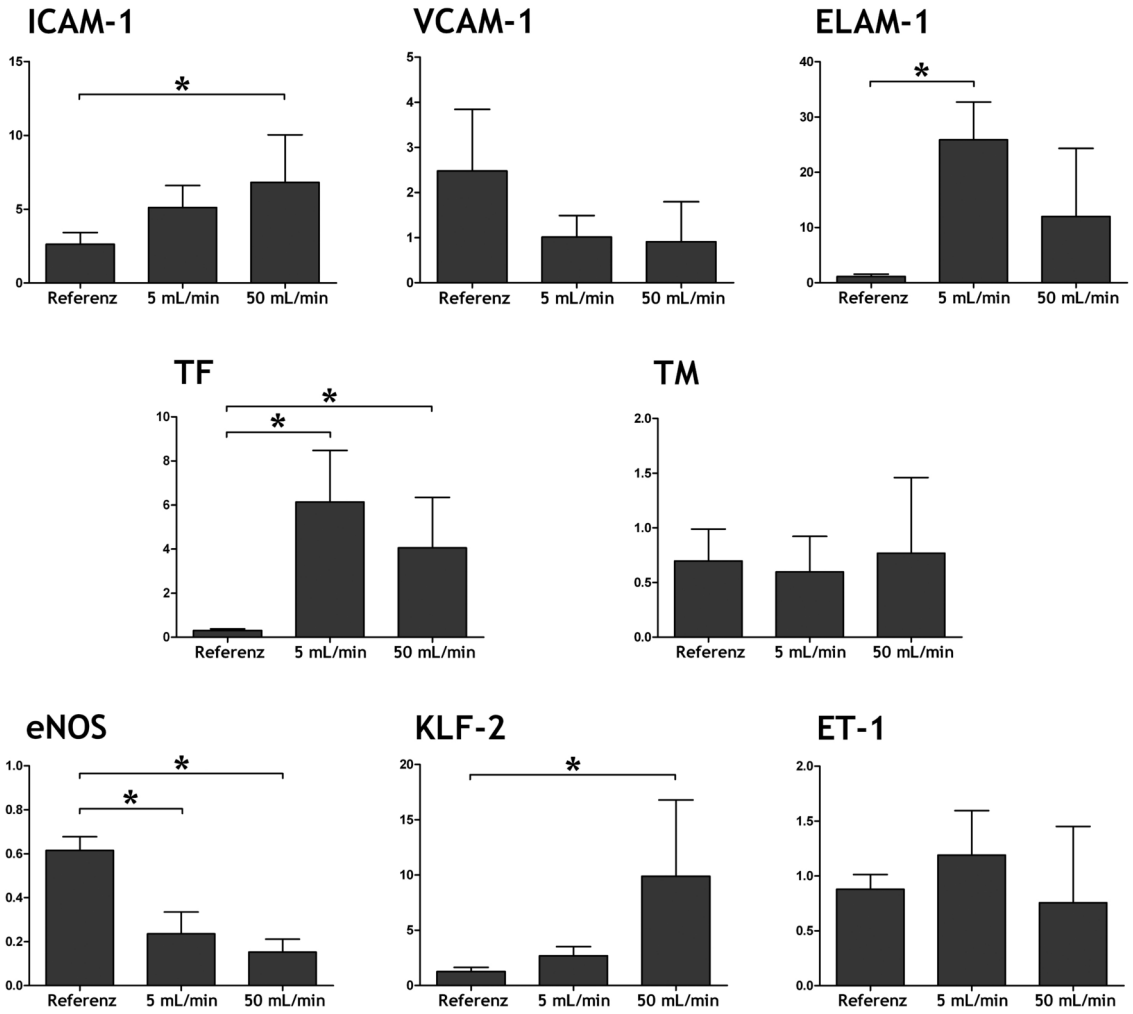


Abb. 32: Relative mRNA-Expression von hCB-ECFCs, die über sechs Tage gemäß dem KR-Protokoll mit 1 rpm auf Oxyplus$^{A/H}$-HFMs kultiviert (Referenz) und anschließend über 6 h einem Fluss von 5 bzw. 50 mL/min ausgesetzt wurden. Die Analyse erfolgte mittels semiquantitativer realtime-PCR (n = 4). Alle statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit einem Stern markiert ($p < 0{,}05$).

Der scherstressresponsive Transkriptionsfaktor KLF-2 wurde auf eine mit ICAM-1 vergleichbare Weise reguliert; ein signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Expression konnte ebenfalls erst bei einem Volumenfluss von 50 mL/min beobachtet werden. Demgegenüber reagierte eNOS – als ebenfalls scherstressabhängig exprimierter Endothelzellmarker – mit einer signifikanten Abnahme des mRNA-Transkriptlevels sowohl nach geringem als auch nach höherem Volumenfluss. Die relativen Expressionswerte des antithrombogen wirksamen TMs sowie des dritten scherstressresponsiven Faktors, ET-1, zeigten sich in der qPCR-Analyse unabhängig vom einwirkenden Volumenfluss nicht signifikant verändert.

4.4.3 Flusskonditionierung

Abschließend wurde in einem ersten Versuch, den progredienten Zellverlust unter Flussbedingungen zu reduzieren, evaluiert, ob die adhärenten hCB-ECFCs durch eine langsame Steigerung des einwirkenden Volumenflusses an ein fließendes Kulturmedium und somit auch an die dadurch auftretenden Scherbelastungen adaptiert werden können. Nach 8-stündiger Konditionierung gefolgt von einer 16-stündigen Plateauphase mit konstantem Fluss konnte fluoreszenzmikroskopisch eine deutlich größere Zahl adhärenter und vitaler hCB-ECFCs identifiziert werden (Abbildung 33 C, D) als nach 24-stündiger Flussexposition unter konstantem Fluss (Abbildung 33 B). Das Verteilungsmuster und die Morphologie der Zellen ähnelten hierbei eher den zuvor nach sechs Stunden Expositionszeit beobachteten Ergebnissen (Abbildung 29 A, C). Spindelförmige Zellkörper sowie eine Ausrichtung der longitudinalen Zellachsen in gemeinsamer Richtung waren auch nach Abschluss der Flusskonditionierung sichtbar, erneut vor allem entlang der lateralen Oberflächen der einzelnen Hohlfasern (Abbildung 33 C, D).

Die relative Quantifizierung (Abbildung 33 E) zeigte auch nach abgeschlossener Flusskonditionierung eine signifikante Abnahme der Zahl adhärenter hCB-ECFCs im Vergleich mit den nahezu konfluent besiedelten Referenzmembranen. Gegenüber HFM-Patches, die nach abgeschlossener Endothelialisierung direkt und bei einer identischen Gesamtexpositionszeit von 24 Stunden einem Fluss von 5 mL/min ausgesetzt wurden, war jedoch ein signifikanter Anstieg der relativen Zahl adhärenter Zellen von 8,7% auf 40,2% sichtbar, was mit den qualitativen Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie korrespondierte.

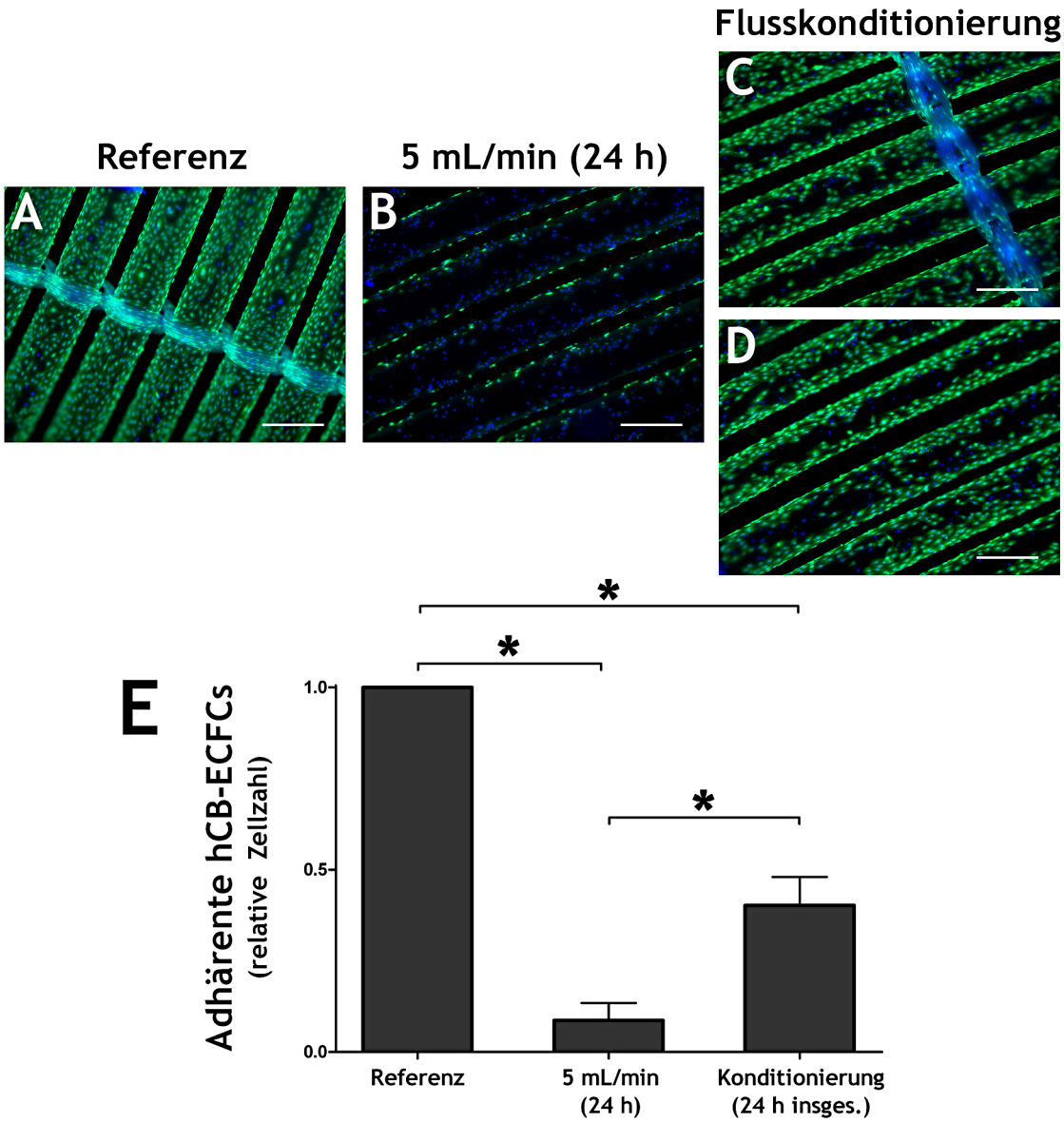


Abb. 33: Adaptation der auf den Oxyplus$^{A/H}$-HFMs kultivierten hCB-ECFCs an einen langsam ansteigenden Volumenfluss. Zu sehen sind repräsentative Aufnahmen nach Ende der sechstägigen Endothelialisierung (**A**), nach 24-stündiger Flussexposition bei 5 mL/min (**B**) und nach Flusskonditionierung über einen Gesamtzeitraum von 24 h (**C**, **D**). Skalierung: 500 µm. Die relative Quantifizierung (**E**) unter Bezugnahme auf den Zeitpunkt vor Beginn der Flussexposition (Referenz) erfolgte erneut durch Zählung der adhärenten hCB-ECFCs (n = 6). Alle statistisch signifikanten Unterschiede wurden mit einem Stern markiert ($p < 0{,}05$).

4.5 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, die Besiedlung polymerer Gasaustausch-HFMs mit endothelialen Zellen humaner Herkunft zu untersuchen und zu optimieren. Dafür wurden aus Nabelschnurblut isolierte, *in vitro* expandierte ECFCs (hCB-ECFCs) verwendet, die nicht nur eine stabile Proliferationsaktivität aufwiesen, sondern auch nach langfristiger Expansion noch typische endotheliale Marker exprimierten.

Eine ausreichende Adhäsion der hCB-ECFCs mit Ausbildung einer endothelialen Zellschicht auf beiden Seiten der HFM-Patches war auf den PMP-Membrantypen grundsätzlich möglich, nicht aber auf den PP-Membrantypen. Dabei konnte eine vitale und nahezu konfluente Einzelzellschicht nur auf den Albumin / Heparin-beschichteten PMP-HFMs des Typs Oxyplus$^{A/H}$ reproduzierbar etabliert und über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen kultiviert werden, was diesen Membrantyp zu dem am besten geeigneten Gerüstmaterial für eine endothelialisierte Biohybridlunge machte. Insbesondere die intakte Beschichtung der polymeren HFMs schien erforderlich, um eine weitgehende Konfluenz der Zellschicht auf den HFM-Oberflächen zu erreichen. Durch den Vergleich unterschiedlicher Kulturprotokolle wurde der Endothelialisierungsprozess zusätzlich optimiert: Eine initiale Rotationsphase von 24 Stunden gefolgt von einer längeren, statischen Kulturperiode von 120 Stunden führte zum qualitativ und quantitativ besten Endothelialisierungsergebnis (Protokoll „KR“), wohingegen die verwendete Rotationsgeschwindigkeit keinen signifikanten Einfluss auf die Zahl der adhärenten Zellen hatte. Systematische Veränderungen in der mRNA-Expression proinflammatorischer oder prothrombogener Faktoren ließen sich im Vergleich mit hCB-ECFCs, die unter Routinebedingungen kultiviert wurden, nicht beobachten. Ferner blieb auf den PMP-HFMs die physiologische Aktivierbarkeit der endothelialen Zellen durch inflammatorische Zytokinstimulation erhalten.

Die experimentell ermittelte Idealkombination aus HFM-Typ und Endothelialisierungsprotokoll (Oxyplus$^{A/H}$-HFMs, KR-Protokoll mit 1 rpm Rotationsgeschwindigkeit) diente als Ausgangspunkt für konsekutive Experimente. Hierzu wurden weitere Membranpatches des Typs Oxyplus$^{A/H}$ auf entsprechende Weise endothelialisiert und anschließend unter dynamischen Bedingungen evaluiert. Es zeigte sich im Rahmen der Versuchsparameter eine zeitabhängige, jedoch flussunabhängige Ablösung der hCB-ECFCs, sodass bereits nach 24-stündiger Flussexposition ein Verlust von rund 90% der zuvor adhärenten Zellen beobachtet werden konnte. Durch eine Adaptation der auf den HFMs angesiedelten hCB-ECFCs an einen graduell zunehmenden Volumenfluss war es allerdings möglich, die Zellretention unter Flussbedingungen signifikant zu verbessern (Anstieg der relativen Zellzahl auf ca. 40% gegenüber zuvor ca. 9%).

5 Diskussion

Durch technische Unterstützungsverfahren kann die moderne Medizin bei Störung oder Ausfall vitaler Organfunktionen für eine wirksame Kompensation sorgen. Trotz des Aufwandes und der hohen Kosten, die mit dem Einsatz derartiger Systeme einhergehen, ist auf Grund eines persistierenden Mangels an Spenderorganen nicht zu erwarten, dass der Bedarf an technischen Methoden zur Organunterstützung abnimmt. Auch der pulmonale Gasaustausch kann bei terminaler respiratorischer Insuffizienz kompensiert werden. Die hohen Komplikationsraten und die zeitlich limitierte Anwendungsdauer verhindern gegenwärtig jedoch eine längerfristige Nutzung extrakorporaler Lungenunterstützungssysteme (siehe Abschnitt 2.1). Dies ist wesentlich der Tatsache geschuldet, dass kein bekanntes Biomaterial der Hämokompatibilität des natürlichen Gefäßendothels gleichkommt (siehe Abschnitt 2.2). Durch eine Besiedlung der synthetischen Oberflächen – im Falle einer Biohybridlunge also primär der Gasaustauschmembranen, welche den größten Flächenanteil ausmachen – mit endothelialen Zellen könnte dieses Problem gelöst werden. Die vorliegende Arbeit soll zur Entwicklung einer auf diese Weise endothelialisierten Biohybridlunge beitragen, die in der Zukunft als dauerhafte Alternative zur Lungentransplantation im Sinne einer *destination therapy* verwendet werden kann.

In ihren Arbeiten zur Endothelialisierung von Titanoberflächen und zur Charakterisierung von ECFCs unter Scherstress formulieren Achneck *et al.* und Brown *et al.* die folgenden Voraussetzungen für eine erfolgreiche Translation zellulärer bzw. endothelialer Blut-Material-Interfaces in die klinische Praxis [69, 119]:

- Es muss eine autologe, leicht zugängliche und zuverlässige Zellquelle verfügbar sein.
- Die verwendeten Zellen müssen einen endothelialen Phänotyp aufweisen, also z.B. spezifische endotheliale Oberflächenmarker exprimieren.
- Die Zellen müssen fest auf dem Substrat- bzw. Gerüstmaterial adhärieren und eine vitale Zellschicht ausbilden.
- Diese Adhäsion der Zellen muss stark genug sein, um den durch den Blutfluss hervorgerufenen Scherkräften dauerhaft standzuhalten.
- Eine ausreichend starke Adhäsion muss ohne vorausgehende Behandlung des Substrats mit einer potentiell prothrombogenen Oberflächenmodifikation möglich sein.
- Die Zellen müssen antithrombogene und antiinflammatorische Eigenschaften aufrechterhalten, vergleichbar dem nicht aktivierten Zustand des nativen Gefäßendothels. Hierzu gehört eine Inhibition der Thrombozytenadhäsion und -aktivierung.

Diese allgemein formulierten Erfordernisse lassen sich mit geringen Limitationen auch auf eine *in vivo* verwendbare Biohybridlunge übertragen. Aus den spezifischen Charakteristika eines bioartifiziellen Lungenunterstützungssystems können jedoch zusätzliche Anfordernungen abgeleitet werden:

- Die verwendeten Zellen müssen in einer ausreichenden Menge generiert werden können, um die Gasaustauschoberflächen konfluent zu endothelialisieren. Falls nicht genügend autologe Zellen vorhanden sind, ist eine alternative Zellquelle notwendig.

- Kann initial keine vollständig konfluente Endothelialisierung erreicht werden, so sollte die verwendete Oberflächenmodifikation selbst über antithrombogene und antiinflammatorische Eigenschaften verfügen; ferner darf sie nicht toxisch sein.

- Die Diffusion der Atemgase über die Gasaustauschmembranen darf weder durch die Oberflächenmodifikation noch durch die etablierte Zellschicht gestört werden.

Angesichts der vorausgegangenen Experimente auf zweidimensionalen Polymerfolien [32] wurde angenommen, dass eine konfluente Schicht nicht aktivierter ECFCs ein ideales Blut-Material-Interface zur Erfüllung möglichst vieler der genannten Voraussetzungen darstellt. Die vorliegende Arbeit soll an erste Machbarkeitsstudien am dreidimensionalen Modell [33] anknüpfen, die Eignung verschiedener Typen von Gasaustausch-HFMs als Substrat der ECFCs – und damit auch als Membrangerüst der Biohybridlunge – testen und die Endothelialisierung der HFMs durch einen Vergleich unterschiedlicher Kulturprotokolle optimieren. Die HFM-Typen und Kulturprotokolle wurden hierfür im Hinblick auf die qualitative und quantitative Endothelialisierungseffizienz, den Aktivierungszustand sowie die inflammatorische Aktivierbarkeit der eingesetzten Zellen verglichen. Das so etablierte 3D-Modell stellt als Ausgangspunkt für nachfolgende Experimente einen entscheidenden Entwicklungsschritt auf dem Weg zur langfristig einsetzbaren Biohybridlunge dar. Da einige der genannten Anforderungen bisher nur unzureichend untersucht wurden, erfolgte bereits ein erstes Anschlussexperiment: Durch Flussexposition der endothelialisierten HFMs wurde analysiert, ob auch unter dynamischen Bedingungen eine ausreichend starke Adhäsion der ECFCs auf dem verwendeten HFM-Typ möglich ist. In der Gesamtauswertung muss nun einerseits die Eignung der endothelialisierten HFMs für weitere *in vitro* - Experimente betrachtet werden, andererseits die perspektivische Tauglichkeit für *in vivo* - Versuche am Tier oder einen späteren Einsatz am Patienten.

5.1 ECFCs als autologe Zellquelle

Zunächst stellt sich die Frage, ob es sich bei einer Endothelialisierung der HFMs mit ECFCs um einen sinnvollen und damit weiterzuverfolgenden Weg handelt – insbesondere im Hinblick auf eine zukünftige klinische Anwendung. Zahlreiche Arbeitsgruppen haben

diesen Zellzyp durch *in vitro* - und *in vivo* - Experimente ausführlich beschrieben (siehe Abschnitt 2.3). Dabei zeigte sich, dass die Isolation von hCB-ECFCs aus dem Nabelschnurblut reifer Neugeborener zuverlässig die Generierung großer Zellmengen gestattet [91]. Theoretisch könnten diese Zellen alle der zu Beginn der Diskussion genannten Anforderungen erfüllen; ihre herausragendste Eigenschaft im Vergleich mit Gefäßwand-Endothelzellen ist aber die hohe Proliferationskapazität bei karyotypischer, phänotypischer und funktioneller Stabilität auch nach langfristiger *in vitro* - Expansion [85, 88, 89, 119]. Übereinstimmend mit der Literatur stellte sich dieses charakteristische Proliferationsverhalten – soweit im Rahmen dieser Arbeit beurteilbar – auch während der Routine-Zellkultur dar. Eine Wiederaussaat von $6-8 \times 10^3$ Zellen / cm^2 während der seriellen Passagierung ermöglichte gleichermaßen eine kontinuierliche Expansion der hCB-ECFCs [91]. Nach unterschiedlichen Zeiträumen durchgeführte RT-PCRs konnten außerdem zeigen, dass die verwendeten Zellen ihr endotheliales Expressionsmuster auf mRNA-Ebene während der *in vitro* - Kultivierung beibehalten, und korrespondieren mit den Ergebnissen vorausgehender Studien [32, 85, 89]. Ferner unterstützen diese Beobachtungen den Standpunkt, ECFCs seien „echte“ EPCs [83] und insbesondere hCB-ECFCs eine gut geeignete Zellquelle für die Endothelialisierung von Biomaterialien im Rahmen wissenschaftlicher Fragestellungen (siehe Abschnitt 2.3.2).
Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit hCB-ECFCs der Passagen 9 bis 18 durchgeführt, welche keine Veränderungen in ihrer Morphologie oder der mRNA-Expression typischer endothelialer Marker aufwiesen. Dieser Ansatz ist realitätsnah gewählt, weil auch vor einer zukünftigen *in vivo* - Applikation endothelialisierter Gasaustausch-HFMs die längerfristige *in vitro* - Expansion einer voraussichtlich kleinen Anzahl von autologen endothelialen Zellen erforderlich sein wird. Da der Fokus dieser Arbeit jedoch nicht auf einer Charakterisierung der verwendeten hCB-ECFCs liegt, sind diesbezüglich weiterführende Experimente notwendig. So deuten die unterschiedlichen Bandenstärken der RT-PCR darauf hin, dass es im Verlauf der *in vitro* - Kultur zu quantitativen Veränderungen in der Expression einzelner Marker gekommen sein könnte, z.B. zu einer abnehmenden vWF-Expression. Als qualitatives Verfahren besitzt die durchgeführte RT-PCR diesbezüglich nur eine limitierte Aussagekraft. Für definitive Aussagen hinsichtlich der mRNA-Expression werden quantitative PCR-Assays benötigt, während die Auswirkungen auf Proteinebene durch zytometrische Methoden (FACS) untersucht werden könnten. In diesem Kontext sollte auch die Expression von Stammzellmarkern sowie myofibroblastären Markern untersucht werden, um eine progrediente mesenchymale Transition der hCB-ECFCs auszuschließen [130], die eine mögliche Ursache für einen Rückgang der Expression einzelner Endothelzellmarker wie vWF darstellen könnte.

Auch aus kryokonserviertem Nabelschnurblut ist die Isolation phänotypisch und funktionell gesunder hCB-ECFCs möglich [131]. Problematisch ist jedoch, dass es sich bei der Nabelschnurblutkonservierung um ein noch junges Verfahren handelt – für das Patientengut der Gegenwart, bei dem in der Regel nicht auf kryokonserviertes Nabelschnurblut

zurückgegriffen werden kann, käme deshalb nur eine Isolation von hAPB-ECFCs als Möglichkeit zur Nutzbarmachung autologer ECFCs in Frage. Auch dieser Zelltyp wurde bereits erfolgreich *in vitro* expandiert [90, 92, 132] und zur Oberflächenendothelialisierung eingesetzt, sodass man davon ausgeht, dass er mit jedem Biomaterial kompatibel ist, welches die zelluläre Adhäsion, Proliferation und Funktionalität nicht behindert [93]. Das Proliferationspotential der hAPB-ECFCs ist den hCB-ECFCs zwar unterlegen, aber immer noch um ein Vielfaches größer als bei Gefäßwand-Endothelzellen [84, 85]. Durch Verzicht auf Xenoproteine während der Expansion [92] erscheint ein autologer Ansatz mit hAPB-ECFCs grundsätzlich möglich, zumal sich auch diese Zellen ohne invasive Gewinnung von Patientengewebe oder -gefäßen isolieren lassen. Ein großes Hindernis besteht jedoch in der Tatsache, dass mit zunehmendem Alter und bei kardiovaskulärer Vorerkrankung sowohl die Proliferationskapazität der hAPB-ECFCs als auch ihre Verfügbarkeit im Blut signifikant absinken [84, 133–135]. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass autologe Zellen insbesondere von dem multimorbiden Patientengut, welches letztlich von der Biohybridlunge profitieren soll, nicht in einem ausreichendem Maße gewonnen und expandiert werden können, um eine Biohybridlunge damit vollständig zu endothelialisieren.

Angesichts möglicher immunologischer Reaktionen gegen allogene ECFCs [96] – nicht nur im endothelialisierten Oxygenator, sondern z.B. auch bei eventueller Abschilferung einzelner Zellen – erscheint die Herstellung einer maßangefertigten Biohybridlunge mit patienteneigenen Zellen dennoch als wünschenswerte, wenn auch gegenwärtig nicht realistische Option. Hierfür müsste zunächst auch bei den schwer und multipel vorerkrankten Patienten, bei denen der Einsatz der Biohybridlunge indiziert wäre, eine zuverlässige Zellquelle zur Isolation autologer ECFCs gefunden werden. Darüber hinaus müssten die isolierten Zellen über eine ausreichend große Proliferationskapazität verfügen. Wenn weder Nabelschnurblut vorhanden noch die Isolation von hAPB-ECFCs aus peripherem Blut möglich ist, könnten geeignete Zellen möglicherweise durch Gabe von Wachstumsfaktoren mobilisiert werden [87, 134]; die Erfolgsaussichten einer solchen Behandlung sind jedoch unklar. Weitere Alternativen zu den ECFCs könnten auch durch eine Differenzierung mesenchymaler Stammzellen [136] oder induziert pluripotenter Stammzellen [137] in endotheliale Zellen generiert werden. Ebenfalls vorstellbar sind allogene Ansätze, sofern immunkompatible Zellspender gefunden oder genetisch modifizierte ECFCs verwendet werden [96, 138]. In der Arbeitsgruppe Biohybridlunge wurde nach Abschluss dieser Arbeit bereits das sog. *HLA-Silencing* von Endothelzellen erprobt, um eine immunkompatible allogene Zellquelle zu erschließen [138]. Obwohl bisher noch durch keines der genannten Lösungskonzepte ausreichend große Mengen geeigneter Zellen für die vollständige Endothelialisierung einer Biohybridlunge generiert wurden, stellen insbesondere die allogenen Lösungsansätze eine vielversprechende Alternative für Patienten dar, bei denen nicht auf ECFCs zurückgegriffen werden kann.

5.2 Endothelialisierung polymerer Gasaustausch-HFMs

Der zelluläre Phänotyp beschreibt die Gesamtheit sämtlicher Merkmale einer Zelle. Er wird maßgeblich durch das mRNA-Expressionsprofil der betreffenden Zelle bestimmt, aus dem die Proteinexpression und damit die jeweilige Funktion folgen. Alle Stufen dieser Kaskade sind von zahlreichen Einflüssen und Regulationsprozessen betroffen, sodass sich innerhalb eines Zelltyps unterschiedliche Differenzierungsmuster ausbilden können. Wie in Abschnitt 2.3 dargelegt, ist auch der Phänotyp endothelialer Zellen ausgesprochen variabel, d.h. er kann durch externe Bedingungen in hohem Maße beeinflusst werden. Dies betrifft nicht nur den Aktivierungszustand eines endothelialen Verbandes, sondern auch seine Morphologie, Vitalität und Proliferation. *In vivo* stellt die extrazelluläre Matrix mitsamt den Möglichkeiten zur Adhäsion einen der wichtigsten Einflussfaktoren dar [139], welcher *in vitro* seine Entsprechung im Kultursubstrat findet [58]. Die Zelladhäsion an Matrix bzw. Substrat erfolgt Integrin-vermittelt und ist mit funktionell bedeutsamen Signalkaskaden eng verknüpft (siehe Abschnitt 2.2.2), was sich unter anderem in der Tatsache zeigt, dass Gefäßwand-Endothelzellen absterben, wenn sie sich nicht suffizient an eine Oberfläche anheften können [140]. Neuere Daten bestätigen eine Beeinflussung der Adhäsion und des Wachstums durch die Oberflächenbeschaffenbeschaffenheit ihres Substrates auch für ECFCs [69].
Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, eine Endothelialisierung polymerer Gasaustausch-HFMs (1.) reproduzierbar durchzuführen, (2.) sie durch Identifikation eines möglichst idealen HFM-Typs in Kombination mit einem geeigneten Kulturprotokoll zu optimieren und (3.) die verwendeten hCB-ECFCs nach erfolgter Endothelialisierung näher zu charakterisieren. Dabei wurde die Etablierung einer vitalen und konfluenten Einzelzellschicht auf der gesamten äußeren HFM-Oberfläche angestrebt. Die Auswertung erfolgte primär qualitativ durch Fluoreszenzmikroskopie und wurde durch eine Zählung der jeweils adhärenten Zellen ergänzt. Da aber eine größere Zahl adhärenter hCB-ECFCs nicht automatisch ein besseres Besiedlungsergebnis bedeutet, diente diese quantitative Analyse vor allem einem objektiveren Vergleich unterschiedlicher Endothelialisierungsansätze bei qualitativ ähnlichem Ergebnis. Eine mögliche Beeinflussung des Aktivierungszustandes durch das Substrat (d.h. die polymere HFM oder ihre Beschichtung) oder das Kulturprotokoll wurde mittels qPCR-Assays untersucht.

Das Polymer PMP gestattet eine Herstellung nicht-poröser Gasaustausch-HFMs, die auf Grund reduzierter Komplikationsraten (siehe Abschnitt 2.1.1) grundsätzlich besser als Gerüst einer Biohybridlunge geeignet scheinen als mikroporöses PP. Ergänzt werden diese bereits bekannten Vorteile [34] dadurch, dass die zelluläre Adhäsion auf den in dieser Arbeit untersuchten PMP-HFMs qualitativ deutlich besser ausfiel als auf den PP-HFMs. Obwohl sowohl die beschichteten als auch die unbeschichteten PMP-HFMs höhere Zahlen adhärenter hCB-ECFCs aufwiesen, bildete sich eine nahezu konfluente Schicht vitaler Zellen nur auf den Albumin / Heparin-beschichteten PMP-HFMs des Typs Oxyplus$^{A/H}$

aus, wie in Abschnitt 4.2.1 dargestellt wurde. In Übereinstimmung damit wiesen die Oxyplus$^{A/H}$-HFMs signifikant höhere Zahlen adhärenter Zellen als alle anderen HFM-Typen auf. Diese Beobachtungen stimmen nicht nur mit den Erfahrungen überein, die zuvor an zweidimensionalen Modellen generiert wurden [32, 64], sondern stützen auch die im Rahmen der vorausgehenden Machbarkeitsstudie gewonnene Erkenntnis, dass dreidimensionale HFMs ebenso konfluent wie plane Folien endothelialisiert werden können [33] – sofern die als Substrat verwendete HFM zuvor durch eine geeignete Beschichtung modifiziert wurde.

Die Endothelialisierungsexperimente bestätigen damit auch, dass die Hydrophobizität eines polymeren Substrates zwar die Adhäsion und Proliferation von hCB-ECFCs reduziert, dieser negative Effekt aber durch Verwendung einer Proteinbeschichtung reduziert werden kann. Als physikalisches Korrelat der durch die Beschichtung abnehmenden Oberflächenhydrophobizität lässt sich goniometrisch ein kleiner werdender Kontaktwinkel nachweisen [32, 61]. Dass es auf den drei unbeschichteten HFM-Typen überhaupt zu einer messbaren Zelladhäsion gekommen ist, könnte am ehesten einer unspezifischen, unregelmäßigen Proteinadsorption aus dem EGM-2 – Medium zugeschrieben werden, wodurch auf den HFM-Oberflächen Bindungsmöglichkeiten für die zellulären Integrine entstanden sind. Ältere Daten belegen, dass die Anheftung endothelialer Zellen an synthetische Biomaterialien wesentlich von der Proteinadsorption aus dem Kulturmedium abhängt [141], wobei Konformation und Menge der adsorbierten Proteine über die Adhäsion der hCB-ECFCs bestimmen [58]. Besonders die Verbindungsfäden zwischen den einzelnen Hohlfasern könnten für derartige Proteinablagerungen prädestiniert sein, was auch mit der vermehrten Thrombusformation korrespondiert, die nach klinischem Einsatz in diesen Arealen beobachtet werden kann [51]. Insgesamt sind die Membrantypen Celgard (PP), Oxyphan (PP) sowie Oxyplus (PMP) ohne eine weitere Oberflächenmodifikation nicht als Gerüst einer Biohybridlunge geeignet; die vorhergehende Beschichtung der HFMs mit Albumin / Heparin ermöglicht demgegenüber eine ausreichende und homogene Adhäsion der endothelialen Zellen.

Zusätzliche Hinweise für die Überlegenheit des beschichteten PMPs liefern die Ergebnisse der Langzeit-Endothelialisierung, denn lediglich auf den Oxyplus$^{A/H}$-HFMs konnten die hCB-ECFCs über vier Wochen bei zufriedenstellender morphologischer Ausprägung der endothelialen Zellschicht mit einer Dichte von rund 2×10^4 Zellen / cm^2 kultiviert werden, was etwa einer konfluenten Zellschicht unter Routinebedingungen entspricht. Dass es dabei nach zwei bis drei Wochen zu Ablösungsprozessen gekommen ist – auch auf den vorbeschichteten HFMs –, deckt sich mit den am zweidimensionalen Modell gewonnenen Beobachtungen von Bos *et al.* [64]. Verantwortlich könnten die Kulturbedingungen sein: Ohne Scherstress fehlt den endothelialen Zellen der zentrale Stimulus für die Synthese von Matrixproteinen, die Ausprägung fokaler Adhäsionskomplexe und die Ausbildung einer starken Bindung der zellulären Integrine an die extrazellulären Integrinliganden [71, 111, 142]. Im Gegensatz zur Zellkulturschale oder -flasche müssen die hCB-ECFCs auf einem frei im Kulturmedium schwimmenden HFM-Patch der einwirkenden Schwer-

kraft widerstehen. Es ist denkbar, dass die initiale Adhäsion der Zellen nicht in jedem Fall stark genug ist, um unter derartigen Bedingungen eine Anheftung über längere Zeiträume zu gewährleisten. Einige hCB-ECFCs könnten sich deshalb ablösen, während die verbliebenen Zellen an Größe zunehmen und die im endothelialen Verband entstandenen Defekte teilweise kompensieren.
Ebenfalls zwischen zweiter und dritter Woche waren keine Zellen mehr am Grund der verworfenen Kulturschalen sichtbar, die zuvor z.B. auf Grund einer unzureichenden Adhäsion nach Zellteilung der Schwerkraft folgend dorthin sedimentiert sein könnten. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass zu diesem Zeitpunkt alle geeigneten HFM-Areale, d.h. alle Bereiche mit intakter Albumin / Heparin-Beschichtung bzw. ausreichender Proteinadsorption aus dem Kulturmedium, bereits vollständig endothelialisiert waren. Weitere Proliferationsvorgänge könnten vor allem auf den Oxyplus$^{A/H}$-HFMs durch Kontaktinhibition gehemmt worden sein [61, 69]. Weil hydrophobe Substrate neben der Adhäsion aber auch die Proliferation endothelialer Zellen herabsetzen [67], könnten fortlaufende Zellteilungen in den Membranbereichen mit defekter Beschichtung bzw. freiliegendem Polymer ebenfalls unterblieben sein.

Viele Forschungsgruppen haben das Problem der Adhäsions- und Proliferationshemmung durch hydrophobe Polymersubstrate erfolgreich durch Verwendung einer Fibronektin-haltigen Beschichtung gelöst [60, 61], was insbesondere auf die bisher veröffentlichten Daten zur Entwicklung endothelialisierter Gasaustauschelemente – zumeist HFMs – für biohybride Lungenunterstützungssysteme zutrifft [125–127, 143]. Während Heparin vor allem mit β_2-Integrinen ($\alpha_M\beta_2$ und $\alpha_X\beta_2$) interagiert [63], erfolgt die endotheliale Bindung an Fibronektin über die Integrine $\alpha_V\beta_3$ und insbesondere $\alpha_5\beta_1$ [65, 119, 144]. Durch quantitative Unterschiede in der Expression der verschiedenen Integrine ist vorstellbar, dass eine endotheliale Zelle über größere Kapazitäten für die Bindung an Fibronektin verfügen könnte und daher eine stärkere Adhäsion möglich ist. Da Fibronektin aber auch die Anheftung und Aktivierung von Thrombozyten unterstützt (siehe Abschnitt 2.2.1), ist dessen Verwendung als Beschichtung nicht unproblematisch: Vor einem klinischen Einsatz müsste sichergestellt werden, dass keinerlei Defekte in der etablierten endothelialen Zellschicht bestehen, die über freiliegendes Fibronektin zum Ausgangspunkt thrombotischer Prozesse werden könnten. Aus diesem Grund hat die Suche nach antithrombogenen, antiinflammatorischen Oberflächenmodifikationen, die gleichzeitig eine Adhäsion endothelialer Zellen erlauben, einen hohen Stellenwert.
In der vorliegenden Arbeit wurde im Gegensatz zu vorausgehenden Studien [125, 126] nicht nur eine humane Zellquelle verwendet, sondern auch demonstriert, dass prothrombogenes Fibronektin bei der Endothelialisierung polymerer HFMs durch eine nicht thrombogene Albumin / Heparin-Beschichtung (siehe Abschnitt 2.2.2) ersetzt werden kann. Dabei konnten fluoreszenzmikroskopisch keine Anzeichen für Veränderungen der Morphologie oder Viabilität der eingesetzten Zellen beobachtet werden. Angesichts der Tatsache, dass bereits eine subkonfluente Endothelialisierung der HFMs das Ausmaß thrombotischer Ablagerungen

signifikant reduziert [126], kann die in der vorliegenden Arbeit erreichte Maskierung der äußeren HFM-Oberflächen durch die hCB-ECFCs trotz einiger Defekte in der endothelialen Zellschicht bereits als Erfolg gewertet werden. Zu beachten ist hierbei, dass *in vivo* jedes Areal exponierten Polymers – vergleichbar freiliegendem Fibronektin – zum Auslöser thrombotischer Prozesse werden kann (siehe Abschnitt 2.2.1). Gibt es kleinere Unregelmäßigkeiten in der etablierten Zellschicht, könnte eine antithrombogene Beschichtung diese zusätzlich maskieren, bis die Defekte von den umliegenden hCB-ECFCs aus geschlossen werden.
Des Weiteren fällt bei einem Vergleich der zellfreien Bereiche endothelialisierter Oxyplus$^{A/H}$-HFMs mit unbesiedeltenen HFM-Patches desselben Typs auf, dass das Verteilungsmuster der hCB-ECFCs mit den Defekten in der Albumin / Heparin-Schicht übereinstimmt (siehe Abschnitt 4.2.2). Es liegt daher nahe, dass nicht nur die angesiedelten Zellen, sondern auch die Beschichtung der HFMs durch mechanische Beanspruchungen während des Endothelialisierungsprozesses beschädigt werden, z.B. durch schwer vermeidbare Reibungsprozesse beim Platzieren der HFM-Patches in den verwendeten Probengefäßen. Besonders deutlich wird dies entlang der äußeren, wandseitigen Hohlfaserscheitel, die als einziges Membranareal stets mehr als nur punktuelle Defekte in der etablierten endothelialen Zellschicht aufgewiesen haben. Zusätzlich lagen bereits vor Versuchsbeginn kleinere, zufällig verteilte Defekte in der Albumin / Heparin-Schicht vor. Daher lässt sich – auch in Anbetracht des nicht zufriedenstellenden Endothelialisierungsergebnisses auf den unbeschichteten PMP-HFMs – das Verteilungsmuster der hCB-ECFCs auf den beschichteten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs am ehesten durch eine defekte Beschichtung erklären. Weil einige der betroffenen Bereiche aber zusätzlich auch DNA-Rückstände aufgewiesen haben, könnte es letztlich zwei unterschiedliche Ursachen für die unvollständige Konfluenz der hCB-ECFCs gegeben haben, welche beide auf mechanischen Stress (insbesondere die Reibung am Probengefäß) während der Versuchsprozeduren zurückgeführt werden können: (1.) Die HFM-Bereiche ohne DNA-Rückstände könnten auf Grund einer Beschädigung der Albumin / Heparin-Beschichtung sowie einer unzureichender Proteinadsorption aus dem Medium nie mit hCB-ECFCs besiedelt gewesen sein. (2.) In den Arealen mit kernartigen DNA-Resten könnten sich demgegenüber adhärente Zellen befunden haben, die jedoch im weiteren Verlauf der Experimente abgestorben sind.
Aus beiden Hypothesen folgt, dass der Umgang mit den HFMs vor zukünftigen *in vitro* - Funktionsassays sowie *in vivo* - Anwendungen optimiert werden muss, um allen vermeidbaren Schäden an der Beschichtung und am etablierten Zellrasen vorzubeugen. Ferner untermauert das gleichartige Erscheinungsbild der Defekte erneut die Notwendigkeit einer intakten Oberflächenmodifikation für die Ausbildung einer vitalen und konfluenten Einzelzellschicht auf den HFMs. Eine Oberflächenmodifikation, die weniger anfällig gegenüber mechanischer Beanspruchung ist, könnte sich dabei als vorteilhaft erweisen.

Unter biomedizinischen wie auch ökonomischen Gesichtspunkten ist es sinnvoll, die *in vitro* - Expansionszeit der verwendeten Zellen zu minimieren. Deswegen sollten zur Endo-

thelialisierung von Biomaterialien so viele hCB-ECFCs wie gerade eben für die Ausprägung einer konfluenten Zellschicht nötig verwendet werden. Obwohl PMP-Oberflächen bereits mit Suspensionen von 6×10^5 Zellen / mL konfluent besiedelt wurden [124], setzten frühere Studien mindestens $1{,}5 \times 10^6$ Zellen / mL zur HFM-Endothelialisierung ein [126]. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, mit 4×10^5 Zellen / mL eine nahezu konfluente Einzelzellschicht auf den PMP-HFMs zu etablieren. Da im nach 24 h Rotation verworfenen Mediumüberstand allerdings zahlreiche, nicht adhärente hCB-ECFCs sichtbar waren, könnte es möglich sein, den Zellbedarf im Rahmen zukünftigen Studien weiter zu reduzieren, um die Effizienz des Endothelialisierungsprozesses zu steigern.
Weiterhin scheinen die Kultivierungsbedingungen einen geringeren Einfluss auf das Besiedlungsergebnis zu haben als der eingesetzte HFM-Typ bzw. dessen Oberflächenmodifikation. Obwohl die Differenz nicht in jedem Falle signifikant gewesen ist, hat das KR-Protokoll auf den PMP-HFMs stets zu höheren Zahlen adhärenter hCB-ECFCs geführt. Es kann daher angenommen werden, dass eine kurze Rotationsphase von 24 Stunden für die vollständige, dreidimensionale Endothelialisierung der HFMs ausreicht. Zwar ist auch bekannt, dass stärkere und länger andauernde Scherkräfte über eine Induktion von Matrix- und Adhäsionsproteinen die Anheftung endothelialer Zellen verbessern können [71, 111, 142], doch eine schnellere Rotation der Probengefäße führte weder zu einem qualitativ besseren Endothelialisierungsergebnis noch zu einer größeren Zahl adhärenter hCB-ECFCs. Die hinsichtlich der Zahl adhärenter Zellen zumeist beobachtete Unterlegenheit des LR-Protokolls spricht sogar für einen negativen Effekt, den die längere Rotationsphase auf die Adhäsion der hCB-ECFCs haben könnte, und korrespondiert dadurch mit den Ergebnissen von Polk *et al.* sowie Takagi *et al.*, die ohne statische Kulturperiode auch auf Fibronektin-beschichteten HFMs keine konfluente Einzelzellschicht etablieren konnten [125, 126]. Zwar können die unterschiedlichen Beschichtungen nicht direkt miteinander verglichen werden, doch bis zum heutigen Tage liegen keine ähnlichen Untersuchungen vor, die an Albumin / Heparin-beschichteten HFMs durchgeführt wurden.
Eine weitere mögliche Ursache der geringeren Zellzahlen nach langer Rotationszeit könnte auch eine Veränderung der Cyclin-Expression sein, auf Grund derer die Zellen unter Scherbelastung ihre Proliferation einstellen [145] – obwohl bisher noch nicht untersucht wurde, ob die hochgradig proliferationsfähigen ECFCs ebenfalls mit einer verminderten Expression ihrer Zellzyklusgene auf einwirkende Scherkräfte reagieren. Diese Frage sollte im Rahmen nachfolgender Studien adressiert werden. Angesichts der konsekutiv durchgeführten Flussexpositionsversuche (s.u.) erscheint jedoch das scherstressbedingte Abschilfern einiger Zellen wahrscheinlicher. Versucht man, diese Hypothese mit den sinkenden Zahlen adhärenter hCB-ECFCs nach mehr als 14 Tagen statischer Kultur zu vereinbaren, so ergibt sich folgendes Modell zur Optimierung der HFM-Endothelialisierung:

1. Initial ist ein **dynamisches System** notwendig, z.B. durch langsame Rotation, um eine Verteilung der endothelialen Zellen über die gesamte HFM-Oberfläche zu ermöglichen.

2. Anschließend erfolgt unter **statischen Bedingungen** eine Adhäsion der Zellen. Eventuelle Defekte im Zellrasen können durch eine Proliferation der umgebenden hCB-ECFCs geschlossen werden, sofern eine intakte HFM-Beschichtung vorliegt. Eine konfluente Einzelzellschicht bildet sich aus, gegebenenfalls kommt es zu Kontaktinhibition.

3. Mittel- bis langfristig wird **Scherstress**, z.B. durch einen schwachen laminaren Fluss, zum Erhalt der etablierten Zellschicht benötigt, da dieser die Zellen zur Produktion eigener Matrixproteine anregt und so ihre Anheftung an die HFM-Oberflächen verstärkt.

Da die Oberflächenretention der Zellen unter Scherstress eine zentrale Voraussetzung für den klinischen Einsatz darstellt, die durch das als Substrat eingesetzte Biomaterial bzw. dessen Beschichtung beeinflusst werden kann [58, 62], sind im weiteren Verlauf dieser Arbeit bestmöglich endothelialisierte HFM-Patches (Membrantyp Oxyplus$^{A/H}$, KR-Protokoll, 1 rpm) unter dynamischen Bedingungen untersucht worden.

5.3 Aktivierungszustand der Zellen nach Endothelialisierung und nach Zytokinstimulation

Neben Adhäsion, Vitalität und Konfluenz sind die antithrombogenen und antiinflammatorischen Eigenschaften der verwendeten Zellen gleichermaßen für einen erfolgreichen klinischen Einsatz der endothelialisierten Gasaustausch-HFMs erforderlich. Es genügt also nicht, die artifiziellen Oberflächen vollständig zu endothelialisieren – vielmehr müssen die angesiedelten hCB-ECFCs auch einen nicht aktivierten Phänotyp vergleichbar dem nativen, unstimulierten Gefäßendothel aufrechterhalten. Sowohl das Substrat als auch die Kultivierungsbedingungen können diesen Aspekt signifikant beeinflussen [58, 67]. Erstaunlicherweise wurde die Expression zentraler Aktivierungsmarker in den bisherigen Studien zur HFM-Endothelialisierung jedoch kaum untersucht; lediglich die vorausgehenden Versuche mit Albumin / Heparin-beschichteten PMP-Folien bzw. -HFMs deuten darauf hin, dass die hCB-ECFCs auch auf entsprechenden HFMs ihren nicht aktivierten Phänotyp sowie ihre Responsivität gegenüber proinflammatorischen Stimuli aufrechterhalten könnten [32, 33]. Um dies zu verifizieren, wurde die zelluläre mRNA-Expression, welche die initiale Reaktion der endothelialen Zellen bei Aktivierung widerspiegelt, via qPCR untersucht. Da es sich bei der PCR allerdings um eine ausgesprochen sensitive Methode handelt, kann ein positives Signal bereits durch wenige aktivierte Zellen entstehen – definitive Aussagen über die Auswirkungen veränderter Expressionsmuster werden deshalb erst in Kombination mit FACS-Analysen und funktionellen Assays möglich sein.
Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Analysen ist es nicht möglich gewesen, Veränderungen der relativen mRNA-Expressionswerte eindeutig mit spezifischen

HFM-Typen oder Kulturprotokollen zu korrelieren. Unabhängig vom verwendeten HFM-Typ gibt es keinen Anhalt für eine allgemeine Aktivierung der hCB-ECFCs. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass die hCB-ECFCs durch eine Kultivierung auf polymeren HFMs nicht grundsätzlich voraktiviert werden oder ihre charakteristische Funktionalität einbüßen. Zwar konnten einige signifikante Abweichungen in der Expression einzelner Marker beobachtet werden, auf die nachfolgend eingegangen werden soll, doch stehen diese in keinem Verhältnis zur Veränderung der mRNA-Transkriptlevel nach Stimulation mit rhuTNF-α. Der Erhalt der entzündlichen Aktivierbarkeit endothelialer Zellverbände auf den PMP-HFMs, der sich vor allem in einer vermehrten Transkription proadhäsiver und prothrombogener Marker nach Inkubation mit rhuTNF-α zeigte, entspricht zudem der physiologischen Reaktion nativer, nicht aktivierter Gefäßwand-Endothelzellen (siehe Abschnitt 2.3.3) und kann als weiteres Anzeichen der Viabilität und intakten Funktion der hCB-ECFCs auf den HFMs gewertet werden.

Zu einer signifikanten, wenn auch schwachen Zunahme der TF – Expression im Vergleich mit der Kontrollgruppe ist es nur in einem Fall gekommen – bei der Kombination aus HFM-Typ und Kulturprotokoll, die zuvor das qualitativ und quantitativ beste Endothelialisierungsergebnis aufgewiesen hat (Membrantyp Oxyplus$^{A/H}$, KR-Protokoll, 1 rpm). Dies ist von besonderem Interesse, weil TF einen typischen Marker aktivierter Endothelzellverbände und einen potenten Initiator der Blutgerinnung darstellt. Die Modulation des Aktivierungszustandes von ECFCs mitsamt den funktionellen Konsequenzen ist bisher weitgehend unerforscht, doch angesichts eines 46,2-fachen Anstieges der TF – mRNA-Expression nach Stimulation mit rhuTNF-α ist wahrscheinlich, dass die 2,4-fache Zunahme des mRNA-Transkriptlevels am Ende der sechstägigen Endothelialisierungszeit keine vollständige Aktivierung des Zellverbandes bedeutet. Da die konstitutive TF – Expression in hCB-ECFCs außerdem signifikant geringer ausfällt als in hAPB-ECFCs [146, 147], könnte die absolute Menge exprimierten TFs trotz dieser Induktion geringer sein als in einem nicht aktivierten Verband endothelialer Zellen beim Erwachsenen.
Ob der antithrombogene und antiinflammatorische Phänotyp der Zellen durch eine Kultivierung auf den HFMs letztlich so stark beeinflusst werden, dass daraus ein funktioneller Nachteil oder ein negativer Effekt unter klinischen Bedingungen folgt, lässt sich gegenwärtig noch nicht sagen. Zytometrische Analysen auf Proteinebene (FACS) sowie funktionelle Untersuchungen, z.B. Thrombozyten- und Leukozytenadhäsions-Assays oder Vollblut-Assays, werden notwendig sein, um die definitiven Auswirkungen der veränderten mRNA-Expression näher zu charakterisieren. Auf endothelialisierten PMP-Folien lässt sich jedoch eine reduzierte Thrombozytenadhäsion beobachten [32], weshalb eine durch die hCB-ECFCs verbesserte Hämokompatibilität auch auf den polymeren HFMs angenommen werden kann. Darüber hinaus werden in einer perfundierten Biohybridlunge Scherkräfte auftreten, die durch eine Induktion von KLF-2 und Reduktion der endothelialen Zytokinsensitivität eine zusätzliche Stabilisierung des antithrombogenen Zellphänotyps und damit auch eine verringerte Expression von TF bewirken könnten [111, 113, 148].

Gegen eine Aktivierung der hCB-ECFCs spricht auch, dass weitere typische Aktivierungsmarker keine vergleichbar erhöhten Transkriptlevel im Rahmen der HFM-Endothelialisierung zeigten, wohl aber nach Stimulation der Zellen mit rhuTNF-α (siehe Abschnitt 4.2.4 bzw. 4.2.5). Die Expression der Adhäsionsfaktoren ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 scheint unabhängig vom polymeren Substrat reguliert zu werden, was mit dem aus früheren Experimenten bekannten Verhalten von Gefäßwand-Endothelzellen korrespondiert; gleiches gilt für die ausgeprägte Induktion aller drei Marker nach inflammatorischer Stimulation [66]. Bei Endothelialisierung der HFMs gemäß dem LR-Protokoll mit 20 rpm, d.h. gemäß dem Kulturprotokoll, welches die stärksten und ausgedehntesten Scherbelastungen während der initialen Rotationsphase erwarten ließ, konnte außerdem ein Rückgang der mRNA-Transkriptlevel von ICAM-1 und VCAM-1 bei konstanter Expression der ELAM-1 – mRNA beobachtet werden. Dies stimmt wiederum mit der typischen Reaktion des Gefäßendothels auf länger einwirkenden Scherstress überein [149]. Es zeigt jedoch auch, dass das verwendete Kultivierungsprotokoll bzw. insbesondere die Rotationsgeschwindigkeit des Glasbehälters zu einer signifikanten Beeinflussung des mRNA-Expressionsprofils der hCB-ECFCs führen kann – im Gegensatz zur Zahl der adhärenten Zellen, welche durch die Rotationsgeschwindigkeit nicht signifikant beeinflusst wurde.
Proinflammatorische Zytokine und bakterielles Lipopolysaccharid wurden als potente Induktoren der Synthese von Adhäsionsmolekülen und TF in unterschiedlichen Subpopulationen endothelialer Zellen bereits extensiv beschrieben [99, 146, 147], auch auf Fibronektin-beschichteten, endothelialisierten HFMs [143]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit korrespondieren mit diesen früheren Studien, die sich anderer Substrate und zellulärer Subtypen bedient haben, und untermauern dadurch die Ähnlichkeit von hCB-ECFCs und Gefäßwand-Endothelzellen sowie den Erhalt der endothelzellspezifischen Aktivierbarkeit nach einer Kultivierung der Zellen auf PMP-HFMs. Sie decken allerdings noch einen zusätzlichen Aspekt der Reaktion von hCB-ECFCs auf Zytokinstimulation auf: Alle durch rhuTNF-α vermehrt exprimierten Transkripte (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, TF) wiesen beim direkten Vergleich der beiden PMP-Membrantypen eine signifikant höhere mRNA-Expression auf den beschichteten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs auf. Laut van der Zijpp *et al.* beeinflusst eher die Zelldichte als das Substrat die CAM-Expression endothelialer Zellen nach proinflammatorischer Stimulation, wobei eine höhere Zelldichte mit stärkerer Induktion der CAMs korreliert [67]. Die ausgeprägtere Transkription der betroffenen mRNAs ließe sich demnach durch die Gestalt der Zellschicht auf den Albumin / Heparin-beschichteten PMP-HFMs erklären: Womöglich erlaubt die nahezu konfluente Einzelzellschicht z.B. über interzelluläre Kommunikationsprozesse eine synergistische Verstärkung der entzündlichen Antwort. Neben ICAM-1 und VCAM-1 sind davon offensichtlich auch ELAM-1 und TF betroffen, die im Rahmen der inflammatorischen Aktivierung auf Oxyplus$^{A/H}$-HFMs ebenfalls in einem signifikant größeren Ausmaß transkribiert wurden.

Obwohl ganze Konzepte zur Entwicklung biohybrider Lungenunterstützungssysteme auf schnell rotierenden Bündeln von HFMs basieren [126], kann der dabei auftretende

Scherstress – ebenso wie der Scherstress im rotierenden Probengefäß – auf Grund eines unterschiedlichen Strömungsprofils nicht direkt mit den Scherkräften verglichen werden, die durch den laminaren, pulsatilen Blutfluss im natürlichen Gefäßbett entstehen. Ferner könnten auch Vorder- und Rückseite des selben HFM-Patches in Abhängigkeit von der Geometrie des Behälters unterschiedlichen Scherbelastungen ausgesetzt sein. Werden Veränderungen im zellulären mRNA-Expressionsprofil abhängig von der Rotationsgeschwindigkeit und -zeit während des Endothelialisierungsprozesses verglichen, müssen diese daher stets als Mittelwerte des gesamten HFM-Patches interpretiert werden. Auch kann die einwirkende Rotationsgeschwindigkeit nicht direkt mit dem tatsächlich auftretenden Scherstress korreliert werden, obwohl höhere Geschwindigkeiten auch höhere Scherbelastungen erwarten lassen (siehe Abschnitt 2.3.4).
Der Transkriptionsfaktor KLF-2, primärer und wichtigster bekannter Mediator der endothelialen Antwort auf flussinduzierte Scherbelastungen, ist dabei der einzige scherstressresponsive Marker, der bei allen 16 Kombinationen aus HFM-Typ und Kultivierungsprotokoll vermehrt transkribiert wurde. Die erhöhte Expression fiel nicht in jedem Fall signifikant aus; überraschenderweise war sie nach Anwendung des LR-Protokolls mit 20 rpm aber am wenigsten stark ausgeprägt. Dies kann durch mögliche Turbulenzen im rotierenden Probengefäß, welche über eine Aktivierung der Zellen [41] die Expression der KLF-2 – mRNA hätten reduzieren können, nicht zufriedenstellend erklärt werden, da andere Endothelialisierungsläufe selbst nach 120 h in statischer Kultur eine stärkere Induktion von KLF-2 zeigten. Möglicherweise entspricht die beobachtete Zunahme der Expression des Transkriptionsfaktors jedoch einer beginnenden Zellantwort auf Scherkräfte, die während der Auswertungsprozedur aufgetreten sein könnten. Weil die durch Veränderungen im einwirkenden Scherstress initiierten Signalkaskaden nach Gewöhnung der Zellen herunter reguliert werden [150], könnten die hCB-ECFCs, welche über fünf Tage einer Rotation von 20 rpm ausgesetzt waren, noch immer an höhere Scherbelastungen angepasst gewesen sein und somit weniger stark auf den während der Auswertung auftretenden Scherstress reagiert haben. Um potentielle Artefakte bei der molekularbiologischen Untersuchung der endothelialisierten HFMs nach Flussexposition zu vermeiden, wurde für die später durchgeführten Experimente im Bioreaktor deshalb ein überarbeiteter Auswertungsalgorithmus angewandt (siehe Abschnitt 3.9.4.3).
Weiterhin liefert die reduzierte KLF-2 – Expression nach mehrstündiger Stimulation der Zellen mit rhuTNF-α zusätzliche Hinweise auf eine Interaktion der scherstress- und zytokinabhängigen Signalkaskaden [110, 112]. Die bekannte Korrelation eines erniedrigten KLF-2 – Transkriptlevels mit einer erhöhten CAM-Expression in endothelialen Zellen (siehe Abschnitt 2.3.4) kann so auch bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten hCB-ECFCs nachvollzogen werden. Da KLF-2 zudem antiinflammatorisch bzw. antithrombogen wirksame Proteine induziert [111], könnte die verminderte Expression von KLF-2 in den rhuTNF-α – stimulierten Zellen direkt zu der beobachteten Repression nachgeschalteter Transkripte (TM und eNOS) beigetragen haben. Die Expression von ET-1 scheint im Gegensatz dazu unabhängig von KLF-2 reguliert zu werden.

5.4 Flussexposition endothelialisierter Oxyplus$^{A/H}$-HFMs

Im ersten Teil dieser Arbeit ist gelungen, ein zuverlässiges Protokoll für die dreidimensionale Endothelialisierung polymerer Gasaustausch-HFMs zu etablieren, das als Ausgangspunkt für konsekutive Experimente geeignet ist. Als wichtigster Einflussfaktor für eine suffiziente Adhäsion der hCB-ECFCs hat sich dabei eine vorausgehende Beschichtung der HFMs herausgestellt, die mit Albumin und Heparin erfolgen kann. In Übereinstimmung mit theoretischen Erwägungen und vorausgehenden Forschungsarbeiten hat die weiterführende Charakterisierung der auf den HFM-Oberflächen kultivierten Zellen zunächst keinen Anhalt dafür ergeben, dass die zu Beginn der Diskussion formulierten Anforderungen für eine Translation in die klinische Praxis durch die endothelialisierten HFMs nicht erfüllt werden könnten. Bevor *in vivo* - Versuche am Tier jedoch ethisch vertretbar und wissenschaftlich sinnvoll werden, sind weitere *in vitro* - Experimente notwendig, um alle bisher noch nicht hinreichend untersuchten Voraussetzungen prüfen und die Funktionalität der besiedelten HFMs sicherstellen zu können. Neben einem unbeeinträchtigten Gasaustausch über die Hohlfasern stellt insbesondere die Retention der etablierten endothelialen Zellschicht unter Flussbedingungen eine solche zentrale Voraussetzung dar. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher im Rahmen eines ersten Anschlussexperimentes am dreidimensionalen Modell versucht, die Flusskomponente der späteren *in vivo* - Situation in einem maßangefertigten Bioreaktor modellhaft nachzubilden.
Auf diesem Wege sollte primär untersucht werden, ob die Albumin / Heparin-vermittelte Adhäsion der hCB-ECFCs an die Oberflächen der PMP-HFMs stark genug ist, um den unter Flussbedingungen auftretenden Scherkräften standzuhalten – und damit perspektivisch auch, ob eine endothelialisierte Biohybdridlunge, die auf einem derartigen Membrangerüst beruht, in einem Tierversuch dem Blutfluss ohne weitere Modifikationen ausgesetzt werden dürfte. Dies ist von besonderem Interesse, weil die bisherigen Versuche bereits darauf hingedeutet haben, dass die Beschichtung der Oxyplus$^{A/H}$-HFMs empfindlich gegenüber mechanischer Beanspruchung sein könnte. Der flussabhängig entstehende Scherstress könnte einen vergleichbaren Einfluss auf die Integrität der endothelialen Zellschicht bzw. auch der Albumin / Heparin-Beschichtung haben. Um zusätzlich die Reaktion der hCB-ECFCs auf die Fluss- und damit Scherbelastung zu charakterisieren und etwaige Aktivierungsprozesse erkennen zu können, erfolgte via qPCR eine erneute Analyse der zellulären mRNA-Expressionsprofile.
Die Berechnung eines einheitlich auf die Zellen einwirkenden Scherstresses war auf Grund der komplexen dreidimensionalen Geometrie der Flusskammer und der darin eingespannten HFM sowie des Flussverlaufs im Bioreaktor nicht möglich. Als Surrogatparameter wurde, in Anlehnung an die klinische Steuerung extrakorporaler Kreisläufe, der Volumenfluss im System verwendet. Alle ermittelten Messdaten, insbesondere die Ergebnisse der molekularbiologischen Expressionsanalyse, spiegeln erneut die Mittelwerte des gesamten, flussexponierten HFM-Patches wider, sodass eventuelle regionale Unterschiede beispiels-

weise zwischen Vorder- und Rückseite unberücksichtigt bleiben.

Nach Flussexposition ist zeitabhängig ein signifikanter Zellverlust aufgefallen, der sowohl anhand der qualitativen als auch anhand der quantitativen Versuchsergebnisse (siehe Abschnitt 4.4.1) nachvollzogen werden kann. Bereits bestehende Defekte im endothelialen Zellrasen, insbesondere entlang der vormals wandseitigen Hohlfaserscheitel, scheinen dabei als Prädilektionsstelle die zunehmende Ablösung zu begünstigen, wohingegen die Verbindungsfäden zwischen den Hohlfasern erneut als Areale mit stärkerer Zelladhäsion imponieren. Das vermehrte Auftreten kernartiger DNA-Rückstände in den Grenzzonen spricht zudem für ein Absterben zuvor vitaler hCB-ECFCs, welches durch insuffizient werdende Adhäsionsmöglichkeiten bedingt sein könnte [140], jedoch nicht in jedem Fall eine vollständige Lösung der zellulären Überreste von der HFM-Oberfläche nach sich gezogen hat. Die beginnende Änderung der Zellausrichtung deckt sich demgegenüber mit dem physiologischen Verhalten endothelialer Zellen unter Scherstress und ist bereits auf anderen Biomaterialien beobachtet worden [69, 114, 151]. Insgesamt muss die Eignung der bis dahin überlegenen Oxyplus$^{A/H}$-HFMs angesichts der Tatsache, dass es bereits nach 24-stündiger Flussexposition zu einer nahezu vollständigen Ablösung der zuvor etablierten Einzelzellschicht gekommen ist, kritisch hinterfragt werden. Ohne eine signifikante Verbesserung der Zellretention unter Flussbedingungen, beispielsweise durch eine vorausgehende Adaptationsphase (s.u.), wäre auch dieser Membrantyp als Gerüstmaterial der Biohybridlunge ungeeignet.
Die Ursache der Zellablösung unter Flussbedingungen könnte darin liegen, dass zwar eine feste Adhäsion der hCB-ECFCs an die Albumin / Heparin-Schicht erfolgt, die Bindung der Proteinbeschichtung an die polymere PMP-Oberfläche aber zu schwach ist, um den auftretenden Scherkräften standzuhalten. Laut Herstellerinformationen handelt sich um ein sog. *Dip-Coating* – d.h., die Beschichtung der Oxyplus$^{A/H}$-HFMs erfolgt ausschließlich durch eine passive Adsorption von Albumin und Heparin. Obwohl die Aussagekraft der ergänzend durchgeführten TAMRA-Färbung begrenzt ist, liegt durch die Flussexposition ein Abblättern der Zellschicht mitsamt der Albumin / Heparin-Beschichtung nahe, z.B. weil die Beschichtung stärker an die Integrine der hCB-ECFCs als an die HFM-Oberfläche gebunden sein könnte. Diese Erklärung erlaubt auch neue Rückschlüsse hinsichtlich der geringeren Zellzahlen, die im Rahmen der HFM-Endothelialisierung nach langen Rotationsphasen (LR-Protokoll) auf Oxyplus$^{A/H}$ beobachtet wurden: Eine nur schwach ausgeprägte Bindung zwischen der polymeren HFM-Oberfläche und der Albumin / Heparin-Schicht könnte über eine Wiederablösung primär adhärenter hCB-ECFCs zu den geringeren Zahlen adhärenter Zellen beigetragen haben.
Auch auf passiv adsorbiertem Fibronektin lösen sich schon nach 30 Minuten Scherbelastung etwa 50% der adhärenten Endothelzellen ab, während kovalent an eine polymere HFM-Oberfläche gebundenes Fibronektin eine endotheliale Zellschicht über drei Stunden Scherstress nahezu vollständig erhalten kann [125]. Andere kovalente Oberflächenmodifikationen scheinen zur Endothelialisierung von Biomaterialien ebenfalls besser geeignet

zu sein als passiv adsorbierte Beschichtungen [62]. So notwendig die Beschichtung der PMP-HFMs für eine zufriedenstellende Endothelialisierung also ist – eine stabile Zelladhäsion unter dynamischen Bedingungen, die lediglich durch passiv adsorbiertes Material vermittelt wird, erscheint angesichts der vorliegenden Ergebnisse nicht realistisch. Deshalb liegt eine der größten Herausforderungen in der weiteren Entwicklung der Biohybridlunge in einer entsprechenden Anpassung der auf den PMP-HFMs eingesetzten Oberflächenmodifikation. Eine mögliche Lösung wäre nicht nur die chemisch stabile Immobilisation von Albumin und Heparin [60], sondern auch die Entwicklung neuartiger Oberflächenmodifikationen, die kovalent an das PMP gebunden oder direkt in das Polymer der HFMs eingebettet sein könnten (siehe Abschnitt 5.6).

Alternativ ist auch denkbar, die Zellen zur vermehrten Produktion eigener Matrixproteine anzuregen, welche als stabiles Netzwerk ähnlich einer Basalmembran die äußeren Oberflächen der Hohlfasern vollständig umhüllen und so die Retention der hCB-ECFCs unter Flussexposition verbessern. In Anbetracht der Zellablösung, die unter statischen Kulturbedingungen zwischen zweiter und dritter Woche beobachtet werden konnte, scheint eine bloße Verlängerung der Kultivierungszeit auf den HFMs dafür nicht auszureichen. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass es durch eine Adaptationsphase mit geringer Fluss- bzw. Scherbelastung möglich ist, endotheliale Zellen auf artifiziellen Oberflächen zur Produktion einer eigenen Basalmembran anzuregen und so die Resistenz der gesamten Einzelzellschicht gegenüber Scherkräften zu steigern [68, 126, 152]. Daher wurde abschließend versucht, die hCB-ECFCs auf den endothelialisierten HFMs graduell an langsam ansteigende Fließraten zu adaptieren (sieht Abschnitt 4.4.3).
Ein qualitativ besseres Ergebnis und eine signifikante Zunahme der Zahl adhärenter hCB-ECFCs sprechen für den positiven Effekt, den eine solche Konditionierungsphase ausübt. Ferner wird hierdurch auch die aus den Ergebnissen der Langzeit-Endothelialisierungsversuche abgeleitete Hypothese gestützt, dass Scherbelastungen im Laufe der Kultivierung endothelialisierter HFMs einen vorteilhaften Effekt auf die Adhäsion der Zellen ausüben könnten. Als mögliche Ursachen hierfür kommen eine scherstressbedingte Induktion und basal betonte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle (z.B. VEcad oder $\alpha_V\beta_3$-Integrin), eine gleichzeitige Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix (z.B. Elastin und Kollagen IV), die als Liganden dieser Adhäsionsmoleküle dienen können, sowie ein zytoskelettales Remodeling mit Ausbildung fester Bindungen zwischen den hCB-ECFCs und der synthetisierten Matrix in Frage [71, 111, 142, 153]. Auch die spindelförmige Elongation der Zellen in Flussrichtung wird durch die initialisierten Signalkaskaden bewirkt, wobei KLF-2 im Mittelpunkt der Zellantwort steht (siehe hierzu Abschnitt 2.2.2 und 2.3.4). Im Rahmen nachfolgender Studien kann näher untersucht werden, welche zellulären Mechanismen für die verbesserte Adhäsion der hCB-ECFCs verantwortlich sind. Hierbei sollte auch eine mögliche Beeinträchtigung der Gasaustauschkapazität durch eventuell synthetisierte Matrixproteine ausgeschlossen werden.
Die zentrale Herausforderung besteht offensichtlich darin, ein geeignetes Gleichgewicht aus

adhäsionsförderlicher Stimulation und progredientem Zellverlust unter Flussbedingungen einzustellen: Obwohl schon geringe Flussraten einen ausreichenden Scherstress hervorrufen, um die Adhäsion der hCB-ECFCs signifikant zu verbessern, kommt es nach wie vor zur Ablösung von mehr als 50% der Zellen. Zwar ließe sich die Zellretention durch einen noch zurückhaltenderen Adaptationsalgorithmus möglicherweise weiter steigern, doch angesichts der vorliegenden Ergebnisse erscheint die Flusskonditionierung allein nicht ausreichend, um unter Flussbelastung einen vollständigen Erhalt der hCB-ECFCs auf der Oberfläche der Oxyplus$^{A/H}$-HFMs gewährleisten zu können. Dies gilt besonders im Hinblick auf die Sicherung von Integrität und Konfluenz der etablierten Zellschicht bei einem langfristigen Einsatz der endothelialisierten HFMs unter deutlich höheren Perfusionsraten, wie sie z.B. auch im Zuge der klinischen Anwendung erforderlich sein werden (5 mL/min im Bioreaktor entsprechen ca. 205 mL/min in einem klinisch einsetzbaren Oxygenator, siehe Tabelle 13). In Kombination mit neuartigen, stabileren Oberflächenmodifikationen kann die Flusskonditionierung aber als geeigneter Anknüpfungspunkt für weitere Untersuchungen dienen; auch Synergismen könnten hierbei möglich sein [151].
Ein weiterer Effekt des Scherstresses ist die Induktion antioxidativer Enzyme in den endothelialen Zellen [145], wodurch es unter dynamischen Bedingungen zu einem besseren Schutz der hCB-ECFCs vor reaktiven Sauerstoffspezies kommen könnte. Dies ist nicht nur klinisch relevant, sondern z.B. auch bei Perfusion des HFM-Lumens mit Sauerstoff im Rahmen nachfolgender *in vitro* - Experimente zur Untersuchung des Gasaustauschkapazität der endothelialisierten HFMs (siehe Abschnitt 5.6).

5.5 Aktivierungszustand der Zellen nach Flussexposition

Frühere Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass durch den Fluss von Blut oder Kulturmedium hervorgerufener Scherstress ein zentralen Modulator der endothelialen Proteinsynthese und -expression ist (siehe Abschnitt 2.3.4). Ausgehend davon wurde unter Flussexposition eine Stabilisierung des antithrombogenen, antiinflammatorischen Phänotyps der hCB-ECFCs vermutet, obgleich z.B. wegen nicht streng laminarer Flussbedingungen abweichende Expressionsmuster möglich sind [41]. Als Indikator für Veränderungen des zellulären Aktivierungszustandes nach sechsstündiger Flussexposition wurde erneut die mRNA-Expression der Zellen, welche auf den HFM-Patches verblieben waren, untersucht. Dabei zeigten sich zwar keine Regulationsprozesse, die mit der Zellaktivierung durch rhuTNF-α vergleichbar gewesen wären, jedoch kam es in geringerem Ausmaß zu einer vermehrten Expression bestimmter Aktivierungsmarker bzw. einer verringerten Expression typischer Scherstressmarker. Weil es nahezu keine spezifischen Daten zur Reaktion von ECFCs auf Scherstress gibt [119], ist es zur Interpretation dieser Beobachtungen notwendig, unterschiedliche Subpopulationen endothelialer Zellen zu vergleichen. Die hohe Sensitivität der Methode PCR muss ebenfalls berücksichtigt werden und betont erneut die Notwendigkeit ergänzender Funktionsassays im Rahmen zukünftiger Studien.

Zunächst fällt die zunehmende, bei höherem Fluss (50 mL/min) signifikante Zunahme des mRNA-Transkriptlevels von ICAM-1 auf. Obwohl einige Autoren unter Scherbelastung einen schwachen Rückgang der Expression dieses Adhäsions- und Aktivierungsmarkers gemessen haben [154], ist in den meisten Studien zur Fluss- bzw. Scherstress-Exposition venöser Gefäßwand-Endothelien ebenfalls ein signifikanter Anstieg der ICAM-1 – Expression beobachtet worden [155–157] – im Gegensatz zu anderen CAMs oder Selektinen. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um einen transienten Anstieg der mRNA-Expression, der bei längerfristiger Flussexposition (24 h) ins Gegenteil umschlagen könnte [149]. Auch unter diesem Gesichtspunkt erscheint es daher sinnvoll, die endothelialisierten HFMs vor einem *in vivo* - Einsatz über längere Zeit unter Flussbedingungen zu kultivieren. Zur Umsetzung wie auch zur Überprüfung dieser Hypothese wird jedoch eine Oberflächenmodifikation benötigt, die auch bei längerer Flussexposition eine ausreichende Zelladhäsion gewährleisten kann. Ferner gibt es bereits Hinweise darauf, dass die flussabhängige Induktion der ICAM-1 – mRNA in hCB-ECFCs weder zu gesteigerter Oberflächenexpression des ICAM-1 – Proteins noch zu verstärkter Leukozytenadhäsion führt [119]. Aus diesem Grund sollten ergänzende phänotypische Untersuchungen (z.B. FACS) und funktionelle Analysen (z.B. Thrombozyten-/Leukozytenadhäsionsassays) im Rahmen von Folgestudien zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt werden.
Im Gegensatz dazu weist VCAM-1 lediglich einen schwachen, nicht signifikanten Rückgang der Transkripte auf, was mit den Literaturangaben übereinstimmt [156]. Es ist allerdings denkbar, dass es bei prolongierter Flussexposition zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Expression [149, 158] sowie einer KLF-2 – vermittelten Abschwächung der zytokinabhängigen Induzierbarkeit [112, 113] kommt.
Ebenso wie VCAM-1 wird auch das Selektin ELAM-1 in endothelialen Zellen NFκB-abhängig exprimiert, obwohl die signifikante Induktion der ELAM-1 – mRNA unter Flussbedingungen eine Beteiligung weiterer Regulationsmechanismen nahelegt. ELAM-1 gilt im Allgemeinen als weniger scherstressresponsiv [149, 156, 157]. Neuere Daten von Punchard *et al.* haben auf mRNA-Ebene jedoch eine signifikante Induktion gezeigt [154], die – vergleichbar ICAM-1 – auf Proteinebene oder funktionell keine Konsequenzen nach sich zu ziehen scheint [119]. Die Ursache der verstärkten Transkription, die auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet worden ist, könnte eine initiale Aktivierung des NFκB-Signalweges auf Grund veränderter Scherbelastungen sein, welche im weiteren Verlauf durch eine Gewöhnung der Zellen an die veränderten Umgebungsbedingungen zunehmend nachlässt [102, 150]. Es könnte sich also ebenfalls um einen transienten Effekt handeln, der bei längerer Expositionszeit oder stärkerem Fluss zunehmend schwächer und von einer Reduktion der Induzierbarkeit begleitet wird [112, 113].
Nach ähnlichem Muster ist auch eine Induktion der TF – mRNA unter Flussbedingungen erfolgt, deren vor allem bei einem geringem Fluss von 5 mL/min (und damit bei einem niedrigem erwarteten Scherstress) starke Ausprägung mit früheren Experimenten korrespondiert [155, 159]. Bei längerer Expositionsdauer oder größeren Scherkräften scheint es dagegen zu einer verminderten mRNA-Expression sowie erneut zur Reduktion der zyto-

kinvermittelten Induzierbarkeit zu kommen [148], während funktionelle Untersuchungen bestätigen, dass auch die prokoagulatorische Aktivität venöser Gefäßwand-Endothelzellen nach vier bis sechs Stunden unter Scherstress ihren Höchststand erreicht, danach aber wieder abnimmt [159].
Die beobachteten mRNA-Expressionsmuster stimmen mit den Schlussfolgerungen von Brown *et al.* überein, laut derer hCB-ECFCs auf Veränderungen des einwirkenden Scherstresses zunächst mit einer vermehrten Expression proinflammatorischer und prothrombogener Aktivierungsmarker reagieren, insbesondere bei schwachem Scherstress [119]. Deswegen lässt sich die eingangs vermutete Stabilisierung des antithrombogenen endothelialen Phänotyps durch den unter Flussbedingungen einwirkenden Scherstress jedoch nicht ausschließen. Vielmehr gibt es Grund zu der Annahme, dass die gesteigerte Expression dieser Marker eine Akutreaktion darstellt, die insbesondere bei länger andauernder Flussexposition wieder abnimmt und womöglich sogar in eine gegenüber den Ruhebedingungen verminderte Expression übergeht, z.B. durch den erwähnten Rückgang der initialen NFκB-Aktivierung [102]. Da sich diese Hypothese aber nur an einer längerfristig exponierten Zellschicht untersuchen lässt, wird die Wichtigkeit einer flussstabilen Oberflächenmodifikation für den Fortschritt des Gesamtprojektes auf diese Weise erneut deutlich.

Bei Betrachtung der scherstressresponsiven Faktoren zeigt sich erwartungsgemäß eine vermehrte Expression der KLF-2 – mRNA [106, 110, 112, 119]; allerdings kommt es erst bei einem Volumenfluss von 50 mL/min zu einer signifikanten Zunahme des Transkriptlevels. Dies korrespondiert zwar mit der vermehrten mRNA-Expression von ELAM-1 und TF bei schwachem Fluss, ist unter einem anderen Gesichtspunkt aber dennoch auffällig: Während es nach sechsstündiger Flussexposition bei 5 mL/min noch nicht zu einer durch KLF-2 – vermittelten Abnahme der mRNA-Expression der endothelialen Aktivierungsmarker gekommen ist, deuten die qualitativen und quantitativen Ergebnisse der Flusskonditionierung darauf hin, dass die Adhäsion der hCB-ECFCs auf den HFM-Oberflächen im gleichen Zeitraum und sogar bei einem Volumenfluss von weniger als 5 mL/min bereits signifikant zunimmt. Dieser Unterschied könnte dadurch bedingt sein, dass es unter Scherstress zunächst zu Veränderungen der zytoskelettalen Architektur mitsamt einer gesteigerten Synthese endothelialer Anheftungsproteine kommt, während die antiinflammatorischen und antithrombogenen Effekte des KLF-2 erst im Anschluss daran wirksam werden [114]. Ein Volumenfluss mit einem ausgeprägten pulsatilen Strömungsprofil könnte die Induktion der KLF-2 – mRNA jedoch beschleunigen oder verstärken [110, 116].
Demgegenüber wurde eNOS im Vergleich mit der nicht flussexponierten Referenzgruppe überraschenderweise in einem signifikant geringeren Ausmaß exprimiert, was im Widerspruch zu dem bekannten Verhalten endothelialer Zellen unter Einwirkung von Scherstress steht [106, 107, 111, 112]. Es ist zwar bereits beobachtet worden, dass hCB-ECFCs nach Flussexposition eine deutlich schwächere eNOS-Induktion aufweisen als arterielle Gefäßwand-Endothelzellen [119], doch angesichts der geringen Unterschiede, die bisher zwischen den verschiedenen endothelialen Subpopulationen und den hCB-ECFCs bestanden haben,

erscheint der Zelltyp als alleinige Erklärung des signifikant verringerten mRNA-Transkriptlevels unzureichend. Denkbar ist dagegen, dass es sich bei der geringeren Expression der eNOS – mRNA ebenfalls um ein transientes Phänomen handelt und es erst bei längerer Flussexposition zu einer Induktion kommt [114]. Auch ein Einfluss des Substrats ist möglich, da die scherstressabhängige eNOS – Expression auf eine Bindung der Zelle an das Basalmembranprotein Laminin angewiesen zu sein scheint [160]. Ob die antithrombogene Funktionalität der auf den HFMs kultivierten hCB-ECFCs durch Flussexposition tatsächlich auch negativ beeinflusst werden kann, muss in nachfolgenden Experimenten untersucht werden – die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen sprechen aber bereits dafür, dass z.B. die effektive NO-Produktion von ECFCs durch Flussexposition eher zu- als abnimmt [69, 119].
Das ebenfalls scherstressresponsive ET-1 sowie der antithrombogene Marker TM schließlich haben keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Transkriptlevel unter Flussbedingungen gezeigt. Auch dieses Ergebnis überrascht zunächst, da die Expression beider Marker direkt mit dem einwirkenden Scherstress bzw. mit dem scherstressabhängig exprimierten KLF-2 zusammenhängt (siehe hierzu Abschnitt 2.3.4). In Anbetracht der übrigen Ergebnisse und der damit zusammenhängenden Regulationsprozesse könnte eine Verlängerung der Expositionszeit aber auch bezüglich dieser Marker weitere Einsichten liefern.

5.6 Fazit und Ausblick

Das Ziel der Arbeitsgruppe Biohybridlunge ist die Entwicklung eines vollständig implantierbaren, biohybriden Lungenunterstützungssystemes, dessen biologische Kompatibilität und damit insbesondere Anwendungszeit durch eine Besiedlung der synthetischen Oberflächen mit geeigneten endothelialen Zellen so weit gesteigert wird, dass es als dauerhafte Alternative zur Lungentransplantation eingesetzt werden kann. Diese Dissertation knüpft an die vorausgehenden Machbarkeitsstudien der Arbeitsgruppe an [32, 33] und soll durch eine Optimierung der HFM-Endothelialisierung am dreidimensionalen Modell einen möglichst idealen Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung der Biohybridlunge schaffen. Dass es grundsätzlich möglich ist, Endothelzellen auf entsprechend modifizierten Gasaustausch-HFMs zu kultivieren, haben frühere Studien bereits belegt [33, 125, 126]. Im Gegensatz zu den bisherigen Endothelialisierungsprotokollen sind in dieser Arbeit jedoch PMP-HFMs mit humanen Zellen und einer weniger thrombogenen Oberflächenbeschichtung [60] kombiniert worden; zusätzlich hat eine ausführlichere Charakterisierung der verwendeten Zellen auf mRNA-Ebene stattgefunden. Es ist gelungen, eine endotheliale Zellschicht auf den HFM-Oberflächen zu etablieren, die typische Charakteristika des physiologischen Gefäßendothels teilt. Allerdings sind auch zahlreiche Anknüpfungspunkte für mögliche Folgestudien sichtbar geworden, auf die nachfolgend eingegangen werden soll.

Zunächst handelt es sich bei den ECFCs um eine leicht zugängliche und zuverlässig

expandierbare Zellquelle, die auf Grund ihrer Proliferationskapazität eine Generierung ausreichend großer Zellmengen für die konfluente Besiedlung eines Membranoxygenators möglich erscheinen lässt. Ferner weisen diese Zellen einen stabilen endothelialen Phänotyp auf, womit sie die zu Beginn der Diskussion genannten Anforderungen bereits weitgehend erfüllen. Obwohl die besonders proliferativen hCB-ECFCs ideal für *in vitro* - Assays geeignet sind, sollten spätestens zukünftige *in vivo* - Experimente möglichst realitätsnah umgesetzt werden – z.B. mit hAPB-ECFCs, die zuvor in FCS-freiem Kulturmedium expandiert wurden [92]. Dem Einsatz autologer ECFCs aus peripherem Blut steht dabei ein wesentliches Hindernis entgegen: die stark reduzierte Verfügbarkeit und Proliferationskapazität dieser Zellen bei alten, vorerkrankten Patienten [84, 133–135]. Gegenwärtig scheint die Isolation und Expansion einer ausreichenden Menge autologer hAPB-ECFCs bei diesem Patientengut nicht realistisch; die Erschließung und Evaluation alternativer Zellquellen hat entsprechend einen hohen Stellenwert. Induziert-pluripotente Stammzellen könnten hierfür geeignet sein, doch allogene Zellquellen stellen – modifiziert durch *HLA-Silencing* – ebenfalls eine vielversprechende Alternative dar [138]. Eine mesenchymale Transition der verwendeten endothelialen Zellen muss stets ausgeschlossen werden.

Die Endothelialisierungsexperimente haben gezeigt, dass eine ausreichende Adhäsion mit Ausbildung einer vitalen, nahezu konfluenten Einzelzellschicht auf den als Substrat eingesetzten HFMs nur durch eine vorhergehende Beschichtung der polymeren Oberflächen möglich ist und es dabei nicht zu einer Voraktivierung der verwendeten Zellen kommt. Obwohl dies für eine Weiterarbeit mit den endothelialisierten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs spricht, ist nach der Flussexposition deutlich geworden, dass eine endotheliale Zellschicht, deren Adhäsion durch passiv adsorbiertes Albumin und Heparin vermittelt wird, keine ausreichende Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherbelastungen besitzt. Es muss angenommen werden, dass eine endothelialisierte Biohybridlunge, die auf einem Oxyplus$^{A/H}$-Membrangerüst basiert, den vom Blutfluss hervorgerufenen Scherkräften im klinischen Einsatz ebenfalls nicht würde standhalten können. Hieraus folgen die nächsten Forschungsprioritäten: Die weitere Entwicklung der Biohybridlunge ist primär auf neuartige Oberflächenmodifikationen angewiesen, denn sowohl weitergehende *in vitro* - Untersuchungen als auch die spätere Translation in die klinische Praxis sind darauf angewiesen, dass eine flussstabile Zelladhäsion auf den HFM-Oberflächen erreicht wird.
Ein bloßer Wechsel des adsorbierten Proteins ist hierfür vermutlich nicht ausreichend, denn das grundlegende Problem würde auf diesem Wege nicht adressiert werden – vielmehr erscheint es notwendig, geeignete Integrinliganden chemisch und mechanisch stabil auf den Oberflächen der polymeren Biomaterialien zu verankern. Soll dies durch kovalente Bindung z.B. von RGD-Peptiden oder Aptameren geschehen, ist zuvor eine chemische Aktivierung des inerten PMPs notwendig. Weil zyklische RGD-Peptide (cRGDs) von endothelialen Zellen besser als lineare RGDs gebunden werden [62], könnten diese als Oberflächenmodifikation geeignet sein. In diesem Fall würden die Vorteile, die man sich von einer chemisch stabileren Oberflächenmodifikation erhofft, jedoch mit einer po-

tentiellen Bindung und Aktivierung von Thrombozyten durch die RGD-Peptide erkauft [41]. Alternativ ist auch eine Einbettung entsprechender Adhäsionsstrukturen direkt in die PMP-HFMs denkbar. In der Arbeitsgruppe Biohybridlunge werden derzeit unter anderem in das Polymer eingebettete, metallische Nanopartikel untersucht [161]. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass einige dieser neuen Oberflächenmodifikationen auch bei über mehrere Stunden einwirkendem, supraphysiologischem Scherstress eine ausreichende Adhäsion der hCB-ECFCs gewährleisten könnten.
Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese neuen Modifikationen ein prothrombotisches Potential aufweisen, welches bei Blutkontakt zur Aktivierung von Thrombozyten oder Enzymen der Gerinnungskaskade führt. Eine Kombination der kovalenten Oberflächenmodifikation mit Heparin, welche auch die Adhäsion der endothelialen Zellen verbessert [162], könnte zwar zusätzlich antikoagulatorisch wirken, wenn Defekte in der etablierten Zellschicht bestehen, hätte jedoch keinen Effekt auf die mögliche Thrombozytenaktivierung durch Läsionen im endothelialen Zellverband. Aus diesen Gründen ist eine kritische Evaluation aller neu entwickelten Oberflächenmodifikationen sowohl vor als auch nach erfolgter Endothelialisierung notwendig, wobei zunehmend auch funktionelle Untersuchungen z.B. mit Vollblut fokussiert werden sollten.

Nach Etablierung einer verbesserten Oberflächenmodifikation und flussstabiler Endothelialisierung der HFMs wird es möglich sein, den Aktivierungszustand der verwendeten Zellen auch nach einer länger andauernden Flussexposition zu analysieren und so viele der Hypothesen zu überprüfen, die sich aus dieser Arbeit ergeben haben. Beispielsweise könnte dann überprüft werden, ob es sich bei der beobachteten Zunahme der mRNA-Expression einzelner Aktivierungsmarker tatsächlich um ein transientes Phänomen handelt. Zusätzlich zur pPCR sollten dann auch FACS-Analysen erfolgen, durch die untersucht werden kann, ob die veränderten mRNA-Transkriptlevel auch phänotypische Auswirkungen nach sich ziehen. Von besonderer Relevanz sind ferner funktionelle Tests (z.B. Thrombozyten- und Leukozyten-Adhäsions-Assays), anhand derer abgeschätzt werden kann, inwiefern die antithrombogenen und antiinflammatorischen Eigenschaften der endothelialen Zellen tatsächlich erhalten bleiben und zu einer Reduktion der oberflächeninduzierten Blutgerinnungsprozesse beitragen können. Auch im Kontext der Flussexposition sollten Experimente mit Vollblut durchgeführt werden – nicht nur wegen der besonderen Rheologie, sondern auch zur Vermeidung falscher Schlussfolgerungen, die aus der isolierten Betrachtung einzelner Systeme des Blutes hervorgehen könnten [58].
Weiterhin ist es notwendig, die Diffusion der Atemgase über die beschichteten und endothelialisierten HFMs, die möglichen Konsequenzen für den Gasaustausch sowie die Auswirkungen des Gasaustauschs auf die verwendeten Zellen zu untersuchen. Ein spezifisch für diese Fragestellungen entworfener Bioreaktor wird gegenwärtig erprobt.
Kann mittels dieser Experimente eine verbesserte Hämokompatibilität der besiedelten HFMs bei erhaltener Gasaustauschleistung bestätigt werden, so wird die *in vivo* - Evaluation eines endothelialisierten Oxygenators im Tierversuch vertretbar. Auf diesem Wege

werden weitere offene Fragen hinsichtlich der Implantation, der Verbindung mit dem Gefäßsystem oder der Möglichkeit einer Perfusion allein durch den rechten Ventrikel adressierbar.

Insgesamt ist noch ist viel Forschungsarbeit erforderlich, bis die endothelialisierte Biohybridlunge erstmals einem terminal lungeninsuffizienten Patienten implantiert werden kann. Da die zunächst als geeignet identifizierten Oxyplus$^{A/H}$-HFMs auf Grund der Art und Ausprägung ihrer Beschichtung Limitationen aufweisen, die unter Flussbedingungen besonders deutlich zu Tage treten, betont die vorliegende Arbeit vor allem die Notwendigkeit neuartiger Oberflächenmodifikationen für den Progress des Gesamtprojektes. Darüber hinaus können die generierten Ergebnisse weitere Einsicht in das bisher nur unzureichend erforschte Gebiet der Endothelialisierung von Gasaustauschmembranen bringen, spezifische Chancen und Hindernisse aufzeigen sowie weitere Anknüpfungspunkte liefern, um den Entwicklungsprozess der Biohybridlunge voranzutreiben.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Eine Transplantation ist die einzige kurative Therapieoption im Endstadium chronisch progredienter Lungenerkrankungen. Da jedoch ein andauernder Mangel an Spenderorganen besteht und nicht jeder terminal lungenkranke Patient als Organempfänger geeignet ist, versterben jedes Jahr zahlreiche Patienten in Ermangelung alternativer Therapiekonzepte. Während der letzten Jahrzehnte ist deshalb die Entwicklung extrakorporaler Lungenunterstützungssysteme vorangetrieben worden. Es handelt sich hierbei trotz aller Fortschritte um komplikationsträchtige Verfahren, die für einen langfristigen Einsatz am Patienten noch nicht geeignet sind. Die Anwendungszeit der Systeme ist auf einige Wochen limitiert, da die eingesetzten Oxygenatoren auf einem diffusiven Gasaustausch über polymere Hohlfasermembranen (HFMs) beruhen. Dabei steht das Patientenblut in ständigem Kontakt mit synthetischen Oberflächen, was zu thrombotischen und inflammatorischen Prozessen führt, die langfristig das Versagen des Oxygenators nach sich ziehen. Eine rein technische Lösung dieses Problems ist nicht absehbar, weshalb die Arbeitsgruppe Biohybridlunge versucht, die Gasaustausch-HFMs mit endothelialen Zellen zu besiedeln (sog. Endothelialisierung) und so die Hämokompatibilität der polymeren HFMs zu verbessern. Am Ziel der Entwicklung soll ein implantierbares Lungenunterstützungssystem stehen, das über Monate oder Jahre hinweg einen sicheren Gasaustausch gewährleisten und als Alternative zur Lungentransplantation dienen kann.

Ziele und Methoden: In direkter Anknüpfung an vorausgehende Machbarkeitsstudien verfolgt die vorliegende Arbeit das Ziel, die Endothelialisierung der polymeren HFMs zu optimieren, um so ein zuverlässiges Modell für konsekutive Experimente zu generieren. Durch Einbeziehung von Poly(4-methyl-1-penten)-HFMs (PMP-HFMs), Verzicht auf eine prothrombogene Oberflächenbeschichtung sowie Verwendung endothelialer koloniebildender Zellen (ECFCs) humaner Herkunft sollten möglichst optimale Ausgangsvoraussetzungen geschaffen werden. Da die Adhäsion und Viabilität der Zellen auf den Gasaustausch-HFMs sowohl durch den eingesetzten HFM-Typ als auch durch die Kulturbedingungen beeinflusst werden könnte, wurden jeweils vier HFMs und Kulturprotokolle nach unterschiedlichen Zeiträumen miteinander verglichen, um die Kombination mit dem qualitativ und quantitativ besten Endothelialisierungsergebnis schrittweise einzugrenzen. Als Zielparameter wurde die Etablierung einer vitalen und möglichst konfluenten Zellschicht auf den äußeren HFM-Oberflächen angestrebt. Ergänzend wurde untersucht, ob das Verteilungsmuster der in dieser Zellschicht beobachteten Defekte mit der Integrität einer eventuell vorhandenen Beschichtung der HFMs korrespondierte. Da durch den HFM-Typ oder das Kulturprotokoll auch eine Beeinflussung des Aktivierungszustandes (und damit des antithrombogenen, antiinflammatorischen Phänotyps) der ECFCs möglich sein könnte, erfolgte außerdem eine molekularbiologische Analyse der zellulären mRNA-Expression nach

Abschluss der Endothelialisierung sowie nach Zytokinstimulation. Auf diesem Wege konnte schließlich ein optimierter Endothelialisierungsalgorithmus etabliert werden. In einem konsekutiven Experiment wurden die so endothelialisierten HFMs in einem maßangefertigten Bioreaktor unter dynamischen Bedingungen inkubiert, um den Erhalt der endothelialen Zellschicht unter Flussbedingungen zu untersuchen. Der Aktivierungszustand der ECFCs abhängig vom einwirkenden Fluss wurde erneut auf mRNA-Ebene analysiert. Zusätzlich wurde getestet, ob die Zellretention durch eine Adaptation der endothelialisierten HFMs an langsam steigende Flussraten verbessert werden kann.

Ergebnisse: In der vorliegenden Arbeit gelang es, polymere Gasaustausch-HFMs reproduzierbar mit *in vitro* expandierten, endothelialen Zellen humaner Herkunft zu besiedeln. Durch einen Vergleich von 16 Kombinationen aus HFM-Typ und Kulturprotokoll konnte der Endothelialisierungsprozess optimiert werden. Obwohl die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Auswertung zeigten, dass PMP-HFMs insgesamt besser endothelialisierbar waren als Polypropylen-HFMs, kam es nur auf Albumin / Heparin-beschichtetem PMP zur Ausbildung einer vitalen und nahezu konfluenten Zellschicht, die über einen Zeitraum von vier Wochen erhalten blieb. Korrespondierend damit wies dieser Membrantyp die signifikant höchste Zahl adhärenter Zellen auf. Das Kulturprotokoll hatte dagegen einen geringeren Einfluss auf das Endothelialisierungsergebnis, während insbesondere eine intakte Beschichtung der HFMs die zentrale Voraussetzung für eine suffiziente Adhäsion der Zellen zu sein schien. Molekularbiologisch konnten keine eindeutigen Hinweise für eine Aktivierung der ECFCs durch den eingesetzten HFM-Typ oder die Kulturbedingungen beobachtet werden. Die physiologische Responsivität der Zellen auf den PMP-HFMs gegenüber proinflammatorischer Zytokinstimulation bleibt jedoch erhalten – vergleichbar dem nativen, nicht aktivierten Gefäßendothel. Nach Flussexposition der endothelialisierten HFMs konnte eine signifikante, zeitabhängige Ablösung der Zellen beobachtet werden, deren Ausmaß durch eine Adaptation an langsam ansteigende Fließgeschwindigkeiten signifikant reduziert werden konnte. Ferner ließ sich unter dynamischen Bedingungen ein moderater Anstieg der Expression einiger Aktivierungsmarker beobachten.

Schlussfolgerung: Bei isolierter Betrachtung der Endothelialisierungsexperimente scheinen die mit Albumin und Heparin beschichteten PMP-HFMs ein geeignetes Gerüst für die Biohybridlunge zu sein. Gegen eine Weiterarbeit mit diesem Membrantyp bzw. einen Einsatz unter *in vivo* - Bedingungen sprechen jedoch die konsekutiv durchgeführten Flussexpositionsversuche. Der unter dynamischen Bedingungen beobachtete Zellverlust könnte dadurch bedingt sein, dass die Beschichtung der HFMs lediglich durch passive Adsorption von Albumin und Heparin erfolgt ist. Im Kontext des Entwicklungsprozesses der Biohybridlunge zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf, dass eine verbesserte Oberflächenmodifikation, die eine Adhäsion der Zellen unter Flussbedingungen sicherstellen kann, essentiell für den weiteren Fortschritt des Gesamtprojektes ist.

7 Abstract

Background: Lung transplantation is the only curative therapeutic option for terminal stage chronic pulmonary disease. Because of a persistent shortage of donor organs and because not every patient suffering from terminal stage pulmonary disease is a suitable organ receiver, a considerable amount of these patients dies every year due to the lack of alternative therapeutic concepts. Therefore, the development of extracorporeal lung assist devices has been expedited during the last decades. Despite all improvements in this field, the clinical use of the resulting procedures is associated with a high risk of complications, so a long-term utilization in patients is not yet feasible. The usage time is limited to a few weeks, because the applied membrane oxygenators are based on a diffusive gas exchange over polymeric hollow fiber membranes (HFMs). Within the oxygenator, the patient's blood is permanently in contact with synthetic surfaces, leading to thrombotic and inflammatory processes finally followed by oxygenator failure. A technical solution for this problem is not to be expected in the near future, so the biohybrid lung research group aims to improve the HFM hemocompatibility by a seeding of the polymeric gas exchange HFMs with endothelial cells (so-called endothelialization). The long-term objective is the development of an implantable lung assist device that will provide a safe gas exchange for months to years and will therefore be usable as an alternative to lung transplantation.

Aims and methods: Directly linking to preliminary proof-of-principle research, this dissertation tries to optimize the endothelialization of polymeric gas exchange HFMs in order to establish a reliable model for subsequent experiments. By inclusion of poly(4-methyl-1-pentene)-HFMs (PMP-HFMs), refraining from the use of a prothrombogenic coating and utilization of endothelial colony-forming cells (ECFCs) of human origin, prerequisites as ideal as possible should be created. Because the cellular adhesion and viability on the gas exchange HFMs might be influenced by the used HFM type or the culture conditions, four HFMs and four culture protocols each were evaluated after different periods of time. Aiming for the establishment of a viable and confluent endothelial monolayer on the outer HFM surfaces, the combination indicating the most suitable qualitative and quantitative endothelialization results was narrowed down step by step. In addition, the distribution of defects within the endothelial layer was compared with the integrity of an eventually present HFM coating. Since alterations of the ECFC activational state (and therefore their antithrombogenic, antiinflammatory phenotype) due to the HFM type or culture protocol might have been possible as well, the cellular mRNA expression profiles were analyzed after completion of the endothelialization process as well as after cytokine stimulation. Finally, an optimized endothelialization algorithm could be established. In a first subsequent experiment, the endothelialized HFMs were incubated in a custom-made bioreactor under dynamic conditions in order to evaluate the retention of the endothelial

cell layer under flow exposure. The ECFC activational state was again analyzed on mRNA level. Furthermore, it was tested if the cellular retention could be improved by a gradual adaptation to slowly increasing flow rates.

Results: In this dissertation, polymeric gas exchange HFMs were reproducibly endothelialized using *in vitro* expanded, endothelial cells of human origin. Due to a comparison of 16 combinations of HFM types and culture protocols, it was possible to optimize the endothelialization procedure. Although the results of the qualitative as well as the quantitative evaluation indicated that PMP-HFMs were more suitable for endothelialization than polypropylene HFMs overall, only albumin / heparin-coated PMP facilitated the establishment of a viable and nearly confluent cellular layer for up to four weeks. Corresponding with this, the coated PMP-HFMs displayed the significantly highest amount of adherent cells. On the contrary, the culture protocol had a lesser influence on the endothelialization outcome, whereas especially an unimpaired HFM coating seemed to be a critical prerequisite for a sufficient cellular adhesion. Regardless of the used HFM type or culture conditions, no distinct indications for an ECFC activation were observed on a molecular level. The physiological responsivity of cells on PMP-HFMs to proinflammatory cytokine stimulation was nevertheless retained – comparable to the native, quiescent vascular endothelium. Flow exposure of endothelialized HFMs lead to a significant and time-dependent cell detachment, but its extend could be significantly reduced by an adaptation to slowly increasing flow rates. Additionally, the flow-exposed ECFCs displayed a moderate increase in the mRNA expression of certain activation markers.

Conclusion: Evaluating only the endothelialization experiments, PMP-HFMs coated with albumin and heparin appear to be a suitable scaffold for the biohybrid lung. Nevertheless, the subsequently performed flow exposure assays provide no recommendation for further research with this HFM type espacially with regard to an *in vivo* - setting. The cellular detachment observed under dynamic conditions might be attributable to the HFM coating procedure, which is performed by a passive adsorption of albumin and heparin. In context of the biohybrid lung developmental process, the results of this dissertation highlight that an improved surface modification that ensures ECFC adhesion under flow is crucial for a further progress of the whole project.

8 Literaturverzeichnis

[1] Meyer AL, Malehsa D, Bara C, Haverich A, Strueber M. Implantation of rotary blood pumps into 115 patients: a single-centre experience. Eur J Cardiothorac Surg. 2013 Jun;43(6):1233–6.

[2] Ono M, Nishimura T, Kinoshita O, Shiga T, Kinugawa K, Nagai R, et al. Improved survival in patients with continuous-flow ventricular assist device for bridge to heart transplantation. Transplant Proc. 2013 Jun;45(5):2017–8.

[3] Strueber M. Extracorporeal support as a bridge to lung transplantation. Curr Opin Crit Care. 2010 Feb;16(1):69–73.

[4] Zwischenberger JB, Anderson CM, Cook KE, Lick SD, Mockros LF, Bartlett RH. Development of an implantable artificial lung: challenges and progress. ASAIO J. 2001 Jul-Aug;47(4):316–20.

[5] Hardy JD. The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). Transplant Proc. 1999 Feb-Mar;31(1-2):25–9.

[6] Gottlieb J. Chronische respiratorische Insuffizienz: Rolle der Lungentransplantation. Pneumologie. 2010 Sep;64(9):604–8.

[7] Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report–2014; focus theme: retransplantation. J Heart Lung Transplant. 2014 Oct;33(10):1009–24.

[8] Trulock EP, Christie JD, Edwards LB, Boucek MM, Aurora P, Taylor DO, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. J Heart Lung Transplant. 2007 Aug;26(8):782–95.

[9] Pierson RN, Barr ML, McCullough KP, Egan T, Garrity E, Jessup M, et al. Thoracic organ transplantation. Am J Transplant. 2004;4 Suppl 9:93–105.

[10] Deutsche Stiftung Organtransplantation. Organspende und Transplantation in Deutschland. Jahresbericht 2014. Frankfurt/Main: Selbstverlag; 2015.

[11] Siegmund-Schultze N. Deutsche Stiftung Organtransplantation: Im Schicksalsjahr. Dtsch Ärztebl. 2013;110(3):A–58 / B–54 / C–54.

[12] Egan TM, Boychuk JE, Rosato K, Cooper JD. Whence the lungs? A study to assess suitability of donor lungs for transplantation. Transplantation. 1992 Feb;53(2):420–2.

[13] Eurotransplant (NL). Eurotransplant International Foundation. Annual Report 2014. Leiden (NL): Selbstverlag; 2015.

[14] Smits JM, Nossent GD, de Vries E, Rahmel A, Meiser B, Strueber M, et al. Evaluation of the lung allocation score in highly urgent and urgent lung transplant candidates in Eurotransplant. J Heart Lung Transplant. 2011 Jan;30(1):22–8.

[15] Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Edwards EB, Novick RJ. Effect of diagnosis on survival benefit of lung transplantation for end-stage lung disease. Lancet. 1998 Jan 3;351(9095):24–7.

[16] Hartert M, Ömer Senbaklavaci, Gohrbandt B, Fischer B, Buhl R, Vahl CF. Lungentransplantation – Therapieoption bei Lungenerkrankungen im Endstadium. Dtsch Ärztebl Int. 2014;111(7):107–16.

[17] McShane PJ, Garrity ER. Impact of the lung allocation score. Semin Respir Crit Care Med. 2013 Jun;34(3):275–80.

[18] Sommerwerck U, Rabis T, Fleimisch P, Carstens H, Teschler H, Kamler M. Lungentransplantation. Herz. 2014 Feb;39(1):74–83.

[19] Gottlieb J, Greer M, Sommerwerck U, Deuse T, Witt C, Schramm R, et al. Introduction of the lung allocation score in Germany. Am J Transplant. 2014 Jun;14(6):1318–27.

[20] Sommer W, Kühn C, Tudorache I, Avsar M, Gottlieb J, Boethig D, et al. Extended criteria donor lungs and clinical outcome: results of an alternative allocation algorithm. J Heart Lung Transplant. 2013 Nov;32(11):1065–72.

[21] Sommer W, Ius F, Salman J, Avsar M, Tudorache I, Kühn C, et al. Survival and spirometry outcomes after lung transplantation from donors aged 70 years and older. J Heart Lung Transplant. 2015 Oct;34(10):1325–33.

[22] Miyamoto E, Sato M, Yamada T, Date H. Successful bilateral lung transplantation from a deceased donor with a ruptured main bronchus. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2015 Sep;21(3):396–8.

[23] Tikkanen JM, Cypel M, Machuca TN, Azad S, Binnie M, Chow CW, et al. Functional outcomes and quality of life after normothermic ex vivo lung perfusion lung transplantation. J Heart Lung Transplant. 2015 Apr;34(4):547–56.

[24] Cypel M, Yeung JC, Machuca T, Chen M, Singer LG, Yasufuku K, et al. Experience with the first 50 ex vivo lung perfusions in clinical transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg. 2012 Nov;144(5):1200–6.

[25] Wallinder A, Ricksten SE, Hansson C, Riise GC, Silverborn M, Liden H, et al. Transplantation of initially rejected donor lungs after ex vivo lung perfusion. J Thorac Cardiovasc Surg. 2012 Nov;144(5):1222–8.

[26] Luc JGY, Bozso SJ, Freed DH, Nagendran J. Successful repair of donation after circulatory death lungs with large pulmonary embolus using the lung organ care system for ex vivo thrombolysis and subsequent clinical transplantation. Transplantation. 2015 Jan;99(1):e1–2.

[27] Mohite PN, Sabashnikov A, García Sáez D, Pates B, Zeriouh M, De Robertis F, et al. Utilization of the Organ Care System Lung for the assessment of lungs from a donor after cardiac death (DCD) before bilateral transplantation. Perfusion. 2015 Jul;30(5):427–30.

[28] Warnecke G, Moradiellos J, Tudorache I, Kühn C, Avsar M, Wiegmann B, et al. Normothermic perfusion of donor lungs for preservation and assessment with the

Organ Care System Lung before bilateral transplantation: a pilot study of 12 patients. Lancet. 2012 Nov 24;380(9856):1851–8.

[29] Fischer S, Simon AR, Welte T, Hoeper MM, Meyer A, Tessmann R, et al. Bridge to lung transplantation with the novel pumpless interventional lung assist device NovaLung. J Thorac Cardiovasc Surg. 2006 Mar;131(3):719–23.

[30] Pesenti A, Zanella A, Patroniti N. Extracorporeal gas exchange. Curr Opin Crit Care. 2009 Feb;15(1):52–8.

[31] Wiegmann B, Hess C, Haverich A, Fischer S. Entwicklung einer Biohybridlunge. Z Herz- Thorax- Gefäßchir. 2009 Sep 4;23:293–7.

[32] Hess C, Wiegmann B, Maurer AN, Fischer P, Möller L, Martin U, et al. Reduced thrombocyte adhesion to endothelialized poly 4-methyl-1-pentene gas exchange membranes-A first step toward bioartificial lung development. Tissue Eng Part A. 2010 Oct;16(10):3043–53.

[33] Wiegmann B, von Seggern H, Höffler K, Korossis S, Dipresa D, Pflaum M, et al. Developing a biohybrid lung - sufficient endothelialization of poly-4-methly-1-pentene gas exchange hollow-fiber membranes. J Mech Behav Biomed Mater. 2016 Feb 11;60:301–11.

[34] Betit P. Extracorporeal membrane oxygenation: quo vadis? Respir Care. 2009 Jul;54(7):948–57.

[35] Fischer S, Hoeper MM, Tomaszek S, Simon A, Gottlieb J, Welte T, et al. Bridge to lung transplantation with the extracorporeal membrane ventilator Novalung in the veno-venous mode: the initial Hannover experience. ASAIO J. 2007 Mar-Apr;53(2):168–70.

[36] Bein T, Weber-Carstens S. Einsatz extrakorporaler Lungenunterstützungsverfahren. Anasthäsiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 2008 Nov;43(11-12):786–91.

[37] Nishinaka T, Tatsumi E, Katagiri N, Ohnishi H, Mizuno T, Shioya K, et al. Up to 151 days of continuous animal perfusion with trivial heparin infusion by the application of a long-term durable antithrombogenic coating to a combination of a seal-less centrifugal pump and a diffusion membrane oxygenator. J Artif Organs. 2007;10(4):240–4.

[38] Matheis G. New technologies for respiratory assist. Perfusion. 2003 Jul;18(4):245–51.

[39] Montoya JP, Shanley CJ, Merz SI, Bartlett RH. Plasma leakage through microporous membranes. Role of phospholipids. ASAIO J. 1992 Jul-Sep;38(3):M399–405.

[40] Puis L, Ampe L, Hertleer R. Case report: plasma leakage in a polymethylpentene oxygenator during extracorporeal life support. Perfusion. 2009 Jan;24(1):51–2.

[41] Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. Biomaterials. 2004 Nov;25(26):5681–703.

[42] Toomasian JM, Schreiner RJ, Meyer DE, Schmidt ME, Hagan SE, Griffith GW, et al. A polymethylpentene fiber gas exchanger for long-term extracorporeal life support. ASAIO J. 2005 Jul-Aug;51(4):390–7.

[43] Fischer S, Hoeper MM, Bein T, Simon AR, Gottlieb J, Wisser W, et al. Interventional lung assist: a new concept of protective ventilation in bridge to lung transplantation. ASAIO J. 2008 Jan-Feb;54(1):3–10.

[44] Fischer S, Bohn D, Rycus P, Pierre AF, de Perrot M, Waddell TK, et al. Extracorporeal membrane oxygenation for primary graft dysfunction after lung transplantation: analysis of the Extracorporeal Life Support Organization (ELSO) registry. J Heart Lung Transplant. 2007 May;26(5):472–7.

[45] Hartwig MG, Walczak R, Lin SS, Davis RD. Improved survival but marginal allograft function in patients treated with extracorporeal membrane oxygenation after lung transplantation. Ann Thorac Surg. 2012 Feb;93(2):366–71.

[46] Martin JT, Zwischenberger JB. Artificial lung and novel devices for respiratory support. Semin Thorac Cardiovasc Surg. 2013;25(1):70–5.

[47] Fuehner T, Kuehn C, Hadem J, Wiesner O, Gottlieb J, Tudorache I, et al. Extracorporeal membrane oxygenation in awake patients as bridge to lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med. 2012 Apr 1;185(7):763–8.

[48] Nosotti M, Rosso L, Tosi D, Palleschi A, Mendogni P, Nataloni IF, et al. Extracorporeal membrane oxygenation with spontaneous breathing as a bridge to lung transplantation. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2013 Jan;16(1):55–9.

[49] Malagon I, Greenhalgh D. Extracorporeal membrane oxygenation as an alternative to ventilation. Curr Opin Anaesthesiol. 2013 Feb;26(1):47–52.

[50] Smits JMA, Mertens BJA, Houwelingen HCV, Haverich A, Persijn GG, Laufer G. Predictors of lung transplant survival in eurotransplant. Am J Transplant. 2003 Nov;3(11):1400–6.

[51] Lehle K, Philipp A, Gleich O, Holzamer A, Müller T, Bein T, et al. Efficiency in extracorporeal membrane oxygenation-cellular deposits on polymethylpentene membranes increase resistance to blood flow and reduce gas exchange capacity. ASAIO J. 2008 Nov-Dec;54(6):612–7.

[52] Gander JW, Fisher JC, Reichstein AR, Gross ER, Aspelund G, Middlesworth W, et al. Limb ischemia after common femoral artery cannulation for venoarterial extracorporeal membrane oxygenation: an unresolved problem. J Pediatr Surg. 2010 Nov;45(11):2136–40.

[53] Bordenave L, Fernandez P, Rémy-Zolghadri M, Villars S, Daculsi R, Midy D. In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization. Clin Hemorheol Microcirc. 2005;33(3):227–34.

[54] van der Zijpp YJT, Poot AA, Feijen J. Endothelialization of small-diameter vascular prostheses. Arch Physiol Biochem. 2003 Dec;111(5):415–27.

[55] Pawlowski KJ, Rittgers SE, Schmidt SP, Bowlin GL. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. Front Biosci. 2004 May 1;9:1412–21.

[56] Elam JH, Nygren H. Adsorption of coagulation proteins from whole blood on to polymer materials: relation to platelet activation. Biomaterials. 1992;13(1):3–8.

[57] Courtney JM, Forbes CD. Thrombosis on foreign surfaces. Br Med Bull. 1994 Oct;50(4):966–81.

[58] McGuigan AP, Sefton MV. The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. Biomaterials. 2007 Jun;28(16):2547–71.

[59] Gartner MJ, Wilhelm CR, Gage KL, Fabrizio MC, Wagner WR. Modeling flow effects on thrombotic deposition in a membrane oxygenator. Artif Organs. 2000 Jan;24(1):29–36.

[60] Bos GW, Scharenborg NM, Poot AA, Engbers GH, Beugeling T, van Aken WG, et al. Blood compatibility of surfaces with immobilized albumin-heparin conjugate and effect of endothelial cell seeding on platelet adhesion. J Biomed Mater Res. 1999 Dec 5;47(3):279–91.

[61] Kottke-Marchant K, Veenstra AA, Marchant RE. Human endothelial cell growth and coagulant function varies with respect to interfacial properties of polymeric substrates. J Biomed Mater Res. 1996 Feb;30(2):209–20.

[62] de Mel A, Jell G, Stevens MM, Seifalian AM. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. Biomacromolecules. 2008 Nov;9(11):2969–79.

[63] Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. J Cell Sci. 2006 Oct 1;119(19):3901–3.

[64] Bos GW, Scharenborg NM, Poot AA, Engbers GH, Terlingen JG, Beugeling T, et al. Adherence and proliferation of endothelial cells on surface-immobilized albumin-heparin conjugate. Tissue Eng. 1998;4(3):267–79.

[65] Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell. 1992 Apr 3;69(1):11–25.

[66] Imbert E, Poot AA, Figdor CG, Feijen J. Expression of leukocyte adhesion molecules by endothelial cells seeded on various polymer surfaces. J Biomed Mater Res. 2001 Sep 5;56(3):376–81.

[67] van der Zijpp YJT, Poot AA, Feijen J. ICAM-1 and VCAM-1 expression by endothelial cells grown on fibronectin-coated TCPS and PS. J Biomed Mater Res A. 2003 Apr 1;65(1):51–9.

[68] McGuigan AP, Sefton MV. The thrombogenicity of human umbilical vein endothelial cell seeded collagen modules. Biomaterials. 2008 Jun;29(16):2453–63.

[69] Achneck HE, Jamiolkowski RM, Jantzen AE, Haseltine JM, Lane WO, 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 Jan;32(1):10–8.

[70] Risau W. Development and differentiation of endothelium. Kidney Int Suppl. 1998 Sep;67:S3–S6.

[71] Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Sep;281(3):L529–33.

[72] Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. J Hematother Stem Cell Res. 2002 Feb;11(1):81–90.

[73] Pearson JD. Endothelial cell function and thrombosis. Baillieres Clin Haematol. 1994 Sep;7(3):441–52.

[74] Risau W. Differentiation of endothelium. FASEB J. 1995 Jul;9(10):926–33.

[75] Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. Leuk Res. 2007 Apr;31(4):439–44.

[76] Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Sep;28(9):1584–95.

[77] Kalashnik L, Bridgeman CJ, King AR, Francis SE, Mikhalovsky S, Wallis C, et al. A cell kinetic analysis of human umbilical vein endothelial cells. Mech Ageing Dev. 2000 Dec 1;120(1-3):23–32.

[78] Garfinkel S, Brown S, Wessendorf JH, Maciag T. Post-transcriptional regulation of interleukin 1 alpha in various strains of young and senescent human umbilical vein endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 15;91(4):1559–63.

[79] Cavallaro U, Castelli V, Monte UD, Soria MR. Phenotypic alterations in senescent large-vessel and microvascular endothelial cells. Mol Cell Biol Res Commun. 2000 Aug;4(2):117–21.

[80] Suggs W, Wart HV, Sharefkin JB. Enzymatic harvesting of adult human saphenous vein endothelial cells: use of a chemically defined combination of two purified enzymes to attain viable cell yields equal to those attained by crude bacterial collagenase preparations. J Vasc Surg. 1992 Jan;15(1):205–13.

[81] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science. 1997 Feb 14;275(5302):964–7.

[82] Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? J Cell Mol Med. 2009 Jan;13(1):87–102.

[83] Critser PJ, Yoder MC. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. Curr Opin Organ Transplant. 2010 Feb;15(1):68–72.

[84] Richardson MR, Yoder MC. Endothelial progenitor cells: quo vadis? J Mol Cell Cardiol. 2011 Feb;50(2):266–72.

[85] Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. Blood. 2004 Nov 1;104(9):2752–60.

[86] Yoder MC. Is endothelium the origin of endothelial progenitor cells? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Jun;30(6):1094–103.

[87] Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. Trends Cardiovasc Med. 2003 Jul;13(5):201–6.

[88] Timmermans F, Hauwermeiren FV, Smedt MD, Raedt R, Plasschaert F, Buyzere MLD, et al. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Jul;27(7):1572–9.

[89] Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. Blood. 2007 Mar 1;109(5):1801–9.

[90] Fuchs S, Hermanns MI, Kirkpatrick CJ. Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. Cell Tissue Res. 2006 Oct;326(1):79–92.

[91] Zeisberger SM, Zoller S, Riegel M, Chen S, Krenning G, Harmsen MC, et al. Optimization of the culturing conditions of human umbilical cord blood-derived endothelial colony-forming cells under xeno-free conditions applying a transcriptomic approach. Genes Cells. 2010 Jun;15(7):671–87.

[92] Reinisch A, Hofmann NA, Obenauf AC, Kashofer K, Rohde E, Schallmoser K, et al. Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo. Blood. 2009 Jun 25;113(26):6716–25.

[93] Fuchs S, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ. Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials. Biomaterials. 2006 Nov;27(31):5399–408.

[94] Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, Hoffmann K, Mayr-Beyrle U, Debatin KM, et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. Cardiovasc Res. 2003 May 1;58(2):478–86.

[95] Javed MJ, Mead LE, Prater D, Bessler WK, Foster D, Case J, et al. Endothelial colony forming cells and mesenchymal stem cells are enriched at different gestational ages in human umbilical cord blood. Pediatr Res. 2008 Jul;64(1):68–73.

[96] Suárez Y, Shepherd BR, Rao DA, Pober JS. Alloimmunity to human endothelial cells derived from cord blood progenitors. J Immunol. 2007 Dec 1;179(11):7488–96.

[97] Pearson JD. The control of production and release of haemostatic factors in the endothelial cell. Baillieres Clin Haematol. 1993 Sep;6(3):629–51.

[98] Monaco C, Paleolog E. Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. Cardiovasc Res. 2004 Mar 1;61(4):671–82.

[99] Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad IN, Brandtzaeg P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. J Immunol. 1996 Apr 1;156(7):2558–65.

[100] Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. FASEB J. 1994 May;8(8):504–12.

[101] Kirchhofer D, Sakariassen KS, Clozel M, Tschopp TB, Hadváry P, Nemerson Y, et al. Relationship between tissue factor expression and deposition of fibrin, platelets, and

leukocytes on cultured endothelial cells under venous blood flow conditions. Blood. 1993 Apr 15;81(8):2050–8.

[102] Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. J Intern Med. 2006 Apr;259(4):381–92.

[103] Papaioannou TG, Stefanadis C. Vascular wall shear stress: basic principles and methods. Hellenic J Cardiol. 2005 Jan-Feb;46(1):9–15.

[104] Silver AE, Vita JA. Shear-stress-mediated arterial remodeling in atherosclerosis: too much of a good thing? Circulation. 2006 Jun 20;113(24):2787–9.

[105] Malek A, Izumo S. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. Am J Physiol. 1992 Aug;263(2 Pt 1):C389–96.

[106] Groenendijk BCW, Hierck BP, Groot ACGD, Poelmann RE. Development-related changes in the expression of shear stress responsive genes KLF-2, ET-1, and NOS-3 in the developing cardiovascular system of chicken embryos. Dev Dyn. 2004 May;230(1):57–68.

[107] Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 17;93(19):10417–22.

[108] Toda N, Tanabe S, Nakanishi S. Nitric oxide-mediated coronary flow regulation in patients with coronary artery disease: recent advances. Int J Angiol. 2011 Sep;20(3):121–34.

[109] Bieker JJ. Krüppel-like factors: three fingers in many pies. J Biol Chem. 2001 Sep 14;276(37):34355–8.

[110] Dekker RJ, van Soest S, Fontijn RD, Salamanca S, de Groot PG, VanBavel E, et al. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2). Blood. 2002 Sep 1;100(5):1689–98.

[111] Dekker RJ, Boon RA, Rondaij MG, Kragt A, Volger OL, Elderkamp YW, et al. KLF2 provokes a gene expression pattern that establishes functional quiescent differentiation of the endothelium. Blood. 2006 Jun 1;107(11):4354–63.

[112] SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A, et al. KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. J Exp Med. 2004 May 17;199(10):1305–15.

[113] Luu NT, Rahman M, Stone PC, Rainger GE, Nash GB. Responses of endothelial cells from different vessels to inflammatory cytokines and shear stress: evidence for the pliability of endothelial phenotype. J Vasc Res. 2010;47(5):451–61.

[114] Boon RA, Leyen TA, Fontijn RD, Fledderus JO, Baggen JMC, Volger OL, et al. KLF2-induced actin shear fibers control both alignment to flow and JNK signaling in vascular endothelium. Blood. 2010 Mar 25;115(12):2533–42.

[115] McCormick SM, Eskin SG, McIntire LV, Teng CL, Lu CM, Russell CG, et al. DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 31;98(16):8955–60.

[116] Wang N, Miao H, Li YS, Zhang P, Haga JH, Hu Y, et al. Shear stress regulation of Krüppel-like factor 2 expression is flow pattern-specific. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Mar 24;341(4):1244–51.

[117] Mohan S, Mohan N, Sprague EA. Differential activation of NF-kappa B in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments. Am J Physiol. 1997 Aug;273(2 Pt 1):C572–8.

[118] Liu M, Kluger MS, D'Alessio A, García-Cardeña G, Pober JS. Regulation of arterial-venous differences in tumor necrosis factor responsiveness of endothelial cells by anatomic context. Am J Pathol. 2008 Apr;172(4):1088–99.

[119] Brown MA, Wallace CS, Angelos M, Truskey GA. Characterization of umbilical cord blood-derived late outgrowth endothelial progenitor cells exposed to laminar shear stress. Tissue Eng Part A. 2009 Nov;15(11):3575–87.

[120] Price AP, England KA, Matson AM, Blazar BR, Panoskaltsis-Mortari A. Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded. Tissue Eng Part A. 2010 Aug;16(8):2581–91.

[121] Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. Science. 2010 Jul 30;329(5991):538–41.

[122] Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomou L, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. Nat Med. 2010 Aug;16(8):927–33.

[123] Song JJ, Kim SS, Liu Z, Madsen JC, Mathisen DJ, Vacanti JP, et al. Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats. Ann Thorac Surg. 2011 Sep;92(3):998–1005.

[124] Trusal LR, Baker CJ, Guzman AW. Transmission and scanning electron microscopy of cell monolayers grown on polymethylpentene coverslips. Stain Technol. 1979 Mar;54(2):77–83.

[125] Takagi M, Shiwaku K, Inoue T, Shirakawa Y, Sawa Y, Matsuda H, et al. Hydrodynamically stable adhesion of endothelial cells onto a polypropylene hollow fiber membrane by modification with adhesive protein. J Artif Organs. 2003;6(3):222–6.

[126] Polk AA, Maul TM, McKeel DT, Snyder TA, Lehocky CA, Pitt B, et al. A biohybrid artificial lung prototype with active mixing of endothelialized microporous hollow fibers. Biotechnol Bioeng. 2010 Jun 15;106(3):490–500.

[127] Burgess KA, Hu HH, Wagner WR, Federspiel WJ. Towards microfabricated biohybrid artificial lung modules for chronic respiratory support. Biomed Microdevices. 2009 Feb;11(1):117–27.

[128] Lick SD, Zwischenberger JB, Alpard SK, Witt SA, Deyo DM, Merz SI. Development of an ambulatory artificial lung in an ovine survival model. ASAIO J. 2001 Sep-Oct;47(5):486–91.

[129] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45.

[130] de Jonge N, Muylaert DEP, Fioretta ES, Baaijens FPT, Fledderus JO, Verhaar MC, et al. Matrix production and organization by endothelial colony forming cells in mechanically strained engineered tissue constructs. PLoS One. 2013 Sep 2;8(9):e73161.

[131] Lin RZ, Dreyzin A, Aamodt K, Dudley AC, Melero-Martin JM. Functional endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood. Cell Transplant. 2011;20(4):515–22.

[132] Kolbe M, Dohle E, Katerla D, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. Enrichment of outgrowth endothelial cells in high and low colony-forming cultures from peripheral blood progenitors. Tissue Eng Part C Methods. 2010 Oct;16(5):877–86.

[133] Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. Circulation. 2003 Jul 29;108(4):457–63.

[134] Dzau VJ, Gnecchi M, Pachori AS, Morello F, Melo LG. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. Hypertension. 2005 Jul;46(1):7–18.

[135] Zhang L, Yang R, Han ZC. Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells: a promising method of therapeutic revascularisation. Eur J Haematol. 2006 Jan;76(1):1–8.

[136] Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, et al. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Oct 1;400(4):461–5.

[137] Choi KD, Yu J, Smuga-Otto K, Salvagiotto G, Rehrauer W, Vodyanik M, et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. Stem Cells. 2009 Mar;27(3):559–67.

[138] Wiegmann B, Figueiredo C, Gras C, Pflaum M, Schmeckebier S, Korossis S, et al. Prevention of rejection of allogeneic endothelial cells in a biohybrid lung by silencing HLA-class I expression. Biomaterials. 2014 Sep;35(28):8123–33.

[139] Macarak EJ, Howard PS. Adhesion of endothelial cells to extracellular matrix proteins. J Cell Physiol. 1983 Jul;116(1):76–86.

[140] Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. Science. 1997 May 30;276(5317):1425–8.

[141] Underwood PA, Bennett FA. A comparison of the biological activities of the cell-adhesive proteins vitronectin and fibronectin. J Cell Sci. 1989 Aug;93:641–9.

[142] Tzima E, del Pozo MA, Shattil SJ, Chien S, Schwartz MA. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. EMBO J. 2001 Sep 3;20(17):4639–47.

[143] Unger RE, Peters K, Huang Q, Funk A, Paul D, Kirkpatrick CJ. Vascularization and gene regulation of human endothelial cells growing on porous polyethersulfone (PES) hollow fiber membranes. Biomaterials. 2005 Jun;26(17):3461–9.

[144] Angelos MG, Brown MA, Satterwhite LL, Levering VW, Shaked NT, Truskey GA. Dynamic adhesion of umbilical cord blood endothelial progenitor cells under laminar shear stress. Biophys J. 2010 Dec 1;99(11):3545–54.

[145] Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Krizanac-Bengez L, Mayberg MR, Hossain MT, et al. Mechanisms of endothelial survival under shear stress. Endothelium. 2002;9(2):89–102.

[146] Zhang Y, Ingram DA, Murphy MP, Saadatzadeh MR, Mead LE, Prater DN, et al. Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 May;296(5):H1675–82.

[147] Cuccuini W, Poitevin S, Poitevin G, Dignat-George F, Cornillet-Lefebvre P, Sabatier F, et al. Tissue factor up-regulation in proinflammatory conditions confers thrombin generation capacity to endothelial colony-forming cells without influencing non-coagulant properties in vitro. J Thromb Haemost. 2010 Sep;8(9):2042–52.

[148] Matsumoto Y, Kawai Y, Watanabe K, Sakai K, Murata M, Handa M, et al. Fluid shear stress attenuates tumor necrosis factor-alpha-induced tissue factor expression in cultured human endothelial cells. Blood. 1998 Jun 1;91(11):4164–72.

[149] Sampath R, Kukielka GL, Smith CW, Eskin SG, McIntire LV. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. Ann Biomed Eng. 1995 May-Jun;23(3):247–56.

[150] Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI. The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Aug 1;97(16):9052–7.

[151] Mathur AB, Truskey GA, Reichert WM. Synergistic effect of high-affinity binding and flow preconditioning on endothelial cell adhesion. J Biomed Mater Res A. 2003 Jan 1;64(1):155–63.

[152] Gulbins H, Pritisanac A, Petzold R, Goldemund A, Doser M, Dauner M, et al. A low-flow adaptation phase improves shear-stress resistance of artificially seeded endothelial cells. Thorac Cardiovasc Surg. 2005 Apr;53(2):96–102.

[153] Fernandez P, Bourget C, Bareille R, Daculsi R, Bordenave L. Gene response in endothelial cells cultured on engineered surfaces is regulated by shear stress. Tissue Eng. 2007 Jul;13(7):1607–14.

[154] Punchard MA, Stenson-Cox C, O'cearbhaill ED, Lyons E, Gundy S, Murphy L, et al. Endothelial cell response to biomechanical forces under simulated vascular loading conditions. J Biomech. 2007;40(14):3146–54.

[155] Yin W, Shanmugavelayudam SK, Rubenstein DA. The effect of physiologically relevant dynamic shear stress on platelet and endothelial cell activation. Thromb Res. 2011 Mar;127(3):235–41.

[156] Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Gimbrone MA. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. J Clin Invest. 1994 Aug;94(2):885–91.

[157] Morigi M, Zoja C, Figliuzzi M, Foppolo M, Micheletti G, Bontempelli M, et al. Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells. Blood. 1995 Apr 1;85(7):1696–703.

[158] Ohtsuka A, Ando J, Korenaga R, Kamiya A, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M. The effect of flow on the expression of vascular adhesion molecule-1 by cultured mouse endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1993 May 28;193(1):303–10.

[159] Lin MC, Almus-Jacobs F, Chen HH, Parry GC, Mackman N, Shyy JY, et al. Shear stress induction of the tissue factor gene. J Clin Invest. 1997 Feb 15;99(4):737–44.

[160] Gloe T, Riedmayr S, Sohn HY, Pohl U. The 67-kDa laminin-binding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide synthase expression. J Biol Chem. 1999 Jun 4;274(23):15996–6002.

[161] Hess C, Schwenke A, Wagener P, Franzka S, Sajti CL, Pflaum M, et al. Dose-dependent surface endothelialization and biocompatibility of polyurethane noble metal nanocomposites. J Biomed Mater Res A. 2014 Jun;102(6):1909–20.

[162] Krijgsman B, Seifalian AM, Salacinski HJ, Tai NR, Punshon G, Fuller BJ, et al. An assessment of covalent grafting of RGD peptides to the surface of a compliant poly(carbonate-urea)urethane vascular conduit versus conventional biological coatings: its role in enhancing cellular retention. Tissue Eng. 2002 Aug;8(4):673–80.

9 Anhang

9.1 Materiallisten

9.1.1 Laborgeräte

Bioreaktoren:	Maßanfertigung, Zentrale Forschungswerkstätten der MHH, Hannover
Brutschränke:	Sanyo CO_2 Incubator MCO-2OAIC, Sanyo Electric Co. Ltd., Moriguchi, J
CASY-Zählgerät:	CASY Cell Counter + Analyser System Model TT, Innovatis AG, Reutlingen
Einfrierbox:	NALGENE Cryo 1 °C Freezing Container (–1 °C/min), Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Gefrierschränke:	Liebherr Premium NoFrost, Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach
	Sanyo VIP Series Ultra Low, Sanyo Electric Co. Ltd., Moriguchi, J
Glaspipetten:	EM Techcolor 10 mL, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Glasreservoir:	modifizierte Schott DURAN Flasche (250 mL), Zentrale Forschungswerkstätten der MHH, Hannover
Laborglas:	Schott DURAN, Mainz
Metallrahmen:	Maßanfertigung, Zentrale Forschungswerkstätten der MHH, Hannover
Mikroskope & Zubehör:	Olympus CKX41, Olympus Corporation, Tokyo, J
	Wärmetisch HT200 W, Minitüb GmbH, Tiefenbach
	Zeiss Axio Observer.A1, Carl Zeiss, Jena
	Zeiss AxioCam MRm, Carl Zeiss, Jena
	Lichtquelle HXP 120, Leistungselektronik Jena GmbH, Jena
	Wärmetisch tempcontrol 37-2 digital, PeCon GmbH, Erbach
	Zeiss Axio Observer.Z1, Carl Zeiss, Jena
	Zeiss AxioCam HSm, Carl Zeiss, Jena
	LED-Lichtquelle Colibri, Carl Zeiss, Jena
Mikrowelle:	MW13141 E, Amica International GmbH, Ascheberg
PCR-Auswertung:	Gießstation, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
	Gelkammer Bio-Rad Sub-Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
	Spannungsquelle Bio-Rad Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
	PCR-Reader Bio-Rad Universal Hood II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
	Gel Doc XR CCD-Camera, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
	UV-Transilluminator Biometra FLX-20 M, Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen

PCR-Cycler:	Mastercycler epgradient S, Eppendorf, Hamburg
	Realplex^2 Mastercycler epgradient S, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter:	WTW pH 539 (Microprocessor pH Meter), Wissenschaftlich-technische Werkstätten GmbH, Weilheim i. OB
Pipetten:	Eppendorf Research 100 – 1000 µL, Eppendorf, Hamburg
	Eppendorf Research 10 – 100 µL, Eppendorf, Hamburg
	Eppendorf Research 0.5 – 10 µL, Eppendorf, Hamburg
	Pipetman P100 N 100 – 1000 µL, Gilson, Middleton, USA
	Pipetman P20 N 20 – 200 µL, Gilson, Middleton, USA
	Pipetman P2 N 2 – 20 µL, Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe:	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präzisionswaage:	Sartorius CPA64, Sartorius AG, Göttingen
Reinstwasseranlage:	Milli-Q, Millipore, Molsheim Cedex, F
Rollerpumpe:	MCP Standard, ISMATEC Laboratoriumstechnik, Wertheim
	Pumpenkopf CA4, ISMATEC Laboratoriumstechnik, Wertheim
	Pumpenschläuche PharMed BPT (2 Manchons, 2.79 mm ID), ISMATEC Laboratoriumstechnik, Wertheim
	Schlauchverbinder Plastik, ISMATEC Laboratoriumstechnik, Wertheim
Rotator:	Universal Turning Device (UTD) 0.1 – 40 rpm, greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
	Control Unit for UTD/RD, greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Sicherheitswerkbank:	Thermo Scientific HERAsafe KS, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Spektrophotometer:	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stahlgeräte:	Stainless steel, Aesculap AG, Tuttlingen
Stickstofftank:	CBS 2300 Series, Custom BioGenic Systems, Romeo, USA
Thermomixer:	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Vortexer:	Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, USA
	MS 3 basic, IKA Labortechnik, Staufen
	Lab dancer, IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad:	GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifugen:	Micro-Centrifuge II, Daihan Labtech Co., Namyangju, ROK
	Thermo Scientific Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Electron LED GmbH, Osterode
	Hermle Z 400 K, HERMLE Labortechnik, Wehingen

9.1.2 Hohlfasermembranen

PMP-HFMs:	Oxyplus$^{A/H}$, Novalung GmbH, Heilbronn
	Oxyplus 90/200, Membrana GmbH, Wuppertal
PP-HFMs:	Oxyphan 50/280, Membrana GmbH, Wuppertal
	Celgard X30-150, Membrana GmbH, Wuppertal

9.1.3 Reagenzien und Medien

Es wurden Chemikalien vom Reinheitsgrad *p.a.* verwendet.

Agarose:	Agarose NEEO Ultra-Qualität ROTIGAROSE f. d. DNA/RNA Elektrophorese, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol:	2-Mercaptoethanol, GIBCO Invitrogen, Paisley, UK
CASYton:	CASYton Isotone Salzlösung, Innovatis AG, Reutlingen
cDNA-Synthese:	Fermentas PureExtreme RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
DMSO:	Dimethyl sulfoxide for molecular biology (>= 99.9%), SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
DNA-Leiter:	Eurogentec SmartLadder, Eurogentec GmbH, Köln
DNase:	RNase-Free DNase Set (For use with RNeasy Columns), QIAGEN GmbH, Hilden
dNTPs:	Fermentas PureExtreme dNTP Set (molecular biology grade), Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
DPBS:	DPBS 1×, GIBCO Invitrogen, Paisley, UK
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
Eisessig:	Essigsäure ROTIPURAN 100% p.a., Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol:	Ethanol 99% (vergällt), Th. Geyer Hamburg GmbH, Renningen
Ethidiumbromid:	Ethidium bromide solution 10 mg/mL, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
Fluorochrome:	Molecular Probes C3100MP calcein AM, Invitrogen, Eugene, USA Molecular Probes Hoechst33342 trihydrochloride trihydrate, Invitrogen, Eugene, USA Molecular Probes 5-(and-6)-carboxytetramethylrodamine succinimidyl ester [5(6)-TAMRA, SE], Invitrogen, Eugene, USA
Gelatine:	Gelatin from porcine skin (Type A), SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
Kulturmedien:	Clonetics EBM-2 (500 mL), Lonza, Walkersville, USA DMEM 1×, GIBCO Invitrogen, Paisley, UK
Natronlauge:	NaOH 1 mol/L, Merck KGaA, Darmstadt
PBS:	Phosphate Buffered Saline (tablets), SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
qPCR:	ABgene ABsolute QPCR SYBR Green Mix 2×, Thermo Fisher Scientific (Abgene House), Epsom, UK
RNA-Isolation:	RNeasy Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden
RT-PCR:	5× Green GoTaq Reaction Buffer, Promega, Madison, USA GoTaq DNA Polymerase 5 U/µL, Promega, Madison, USA
Salzsäure:	HCl 1 mol/L, Merck KGaA, Darmstadt
Supplements:	Clonetics EGM-2 SingleQuots, Lonza, Walkersville, USA Penicillin / Streptomycin (10000 U/mL), Biochrom AG, Berlin Foetal Bovine Serum (EU approved origin), GIBCO Invitrogen, Paisley, UK
Trennlösung:	Biocoll Separating Solution (1.077 g/mL), Biochrom AG,

	Berlin
Tris-Puffer:	TRIS Ultra-Qualität PUFFERAN Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin:	Trypsin-EDTA (10×; 0,5% Trypsin + 0,2% EDTA), PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Wasser für PCR:	Aqua ad iniectabilia, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Zytokine:	rec TNF-α (human) 10 µg, Bachem AG, Bubendorf, CH

9.1.4 Verbrauchsmaterialien

CASYcups:	CASYcups, Schärfe System GmbH, Reutlingen
Kryoröhrchen:	CRYO.S with srew cap (sterile), greiner bio-one, Frickenhausen
Luer-Verschlüsse:	Combi Stopper, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
PCR-Gefäße:	PCR Softstrips 0.2 mL blau, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen:	Pipettenspitze 10 µL (farblos), Sarstedt AG, Nümbrecht
	Pipettenspitze 200 µL (gelb), Sarstedt AG, Nümbrecht
	Pipettenspitze 1000 µL (blau), Sarstedt AG, Nümbrecht
	filter tip 10 E, greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, A
	filter tip FT 100, greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, A
	filter tip 1000 (E), greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, A
Probengefäße:	CELLSTAR PP tubes 15 mL (sterile), greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
	CELLSTAR PP tubes 50 mL (sterile), greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
qPCR-Platten:	96-Well Multiply-PCR Plate, Sarstedt AG, Nümbrecht
	Klebefolie optisch klar (RNAse-/DNAse-frei), Sarstedt AG, Nümbrecht
Reaktionsgefäße:	Safe Lock Tubes 0.5 mL, Eppendorf, Hamburg
	Safe Lock Tubes 1.5 mL, Eppendorf, Hamburg
	Safe Lock Tubes 2.0 mL, Eppendorf, Hamburg
Sixwell-Platten:	nunclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
Spritzen:	Injekt 10 mL, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
	Injekt 20 mL, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzenfilter:	Rotilabo-Spitzenfilter steril (0.22 µm), Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Verbindungsschläuche:	Heidelberger Verlängerung, Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Zellkulturflaschen:	75 cm^2 nunclon treated flask, Nunc A/S, Roskilde, DK
	175 cm^2 nunclon treated flask, Nunc A/S, Roskilde, DK
Zellkulturschalen:	CELLSTAR Tissue Culture Dishes (60×15 mm), greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
	CELLSTAR Tissue Culture Dishes (100×20 mm), greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellschaber:	Cell Scraper 23 cm (radiation sterilized), Nalge Nunc International, Rochester, USA

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hohlfasermembran (Schema) . . . 13
Abbildung 2: Novalung iLA-Membranoxygenator . . . 15
Abbildung 3: Thrombenbildung auf Gasaustausch-HFM . . . 18
Abbildung 4: Der biohybride Lösungsansatz (Schema) . . . 29
Abbildung 5: Beispiel für Gelelektrophorese einer GAPDH-PCR . . . 38
Abbildung 6: Größenverhältnisse eines HFM-Patches . . . 40
Abbildung 7: Rotationsbesiedlung (Schema und Photos) . . . 41
Abbildung 8: Endothelialisierte HFMs in statischer Kultur . . . 42
Abbildung 9: Flusskammer (Schema) . . . 50
Abbildung 10: Abmessungen und Photos der Flusskammer . . . 51
Abbildung 11: Flusskreislauf (Schema) . . . 54
Abbildung 12: Routinekultur von hCB-ECFCs (P7) . . . 56
Abbildung 13: RT-PCR nach Langzeitexpansion . . . 57
Abbildung 14: Sechs-Tage-Endothelialisierung: Oxyplus$^{A/H}$ (PMP) . . . 59
Abbildung 15: Sechs-Tage-Endothelialisierung: Oxyplus (PMP) . . . 59
Abbildung 16: Sechs-Tage-Endothelialisierung: Oxyphan (PP) . . . 60
Abbildung 17: Sechs-Tage-Endothelialisierung: Celgard (PP) . . . 60
Abbildung 18: Sechs-Tage-Endothelialisierung: Quantifizierung . . . 61
Abbildung 19: Oxyplus$^{A/H}$-Endothelialisierung im Seitenvergleich . . . 63
Abbildung 20: Analyse der Oxyplus$^{A/H}$-Beschichtung . . . 64
Abbildung 21: Langzeit-Endothelialisierung: PMP . . . 66
Abbildung 22: Langzeit-Endothelialisierung: PP . . . 67
Abbildung 23: Langzeit-Endothelialisierung: Oxyplus$^{A/H}$ (vergrößert) . . . 68
Abbildung 24: Langzeit-Endothelialisierung: Quantifizierung . . . 69
Abbildung 25: qPCR: Endothelialisierung bei 1 rpm . . . 72
Abbildung 26: qPCR: Endothelialisierung bei 20 rpm . . . 73
Abbildung 27: Stimulation endothelialisierter PMP-HFMs mit rhuTNF-α . . . 74
Abbildung 28: Referenzabbildungen vor Flussexposition . . . 76
Abbildung 29: Flussexposition endothelialisierter HFMs bei 5 mL/min . . . 77
Abbildung 30: Flussexposition endothelialisierter HFMs bei 50 mL/min . . . 78
Abbildung 31: Relative Quantifizierung nach Flussexposition . . . 79
Abbildung 32: qPCR nach Flussexposition . . . 80
Abbildung 33: Flusskonditionierung (qualitativ und quantitativ) . . . 82

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigste LTx-Indikationen 9
Tabelle 2: Charakteristika humaner EPCs 23
Tabelle 3: Zellkulturmedien und -lösungen 33
Tabelle 4: Materialien für RNA-Extraktion 35
Tabelle 5: Materialien für RT-PCR 37
Tabelle 6: Primersequenzen für RT-PCR 39
Tabelle 7: HFM-Typen 40
Tabelle 8: Kulturprotokolle über sechs Tage 42
Tabelle 9: Übersicht Färbelösungen nach Experiment 44
Tabelle 10: Übersicht Fluorochrome 44
Tabelle 11: Primersequenzen für qPCR 47
Tabelle 12: Parameter der Flussexpositionsversuche 52
Tabelle 13: Fluss- und Volumenaustauschraten 53
Tabelle 14: Signifikante Abweichungen der mRNA-Transkriptlevel 70

9.4 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Kongressbeiträge:

Wiegmann B, Zwirner U, Hess C, Fischer S, Hilfiker A, Haverich A. *Development of a biohybrid lung – comparative endothelialization of different gas exchange membranes.* 57th Annual Conference of the American Society for Artificial Internal Organs; 2011 Jun 10-12; Washington DC, USA.

Poster:

Wiegmann B, Pflaum M, Zwirner U, Korossis S, Haverich A. *Towards the development of a biohybrid lung – Identification of an endothelialisable gas exchange membrane material.* 2nd Annual DZL Meeting; 2013 Jan 29-30; Bad Nauheim, Germany.

Publikationen:

Zwirner U, Ismail I, Kühn C, Höffler K, Korossis S, Pflaum M, Haverich A, Wiegmann B. *The endothelialisation of different polymeric gas exchange hollow fiber membranes – A new approach to identify a suitable biohybrid lung scaffold material and an optimized seeding protocol.* Veröffentlichung in Vorbereitung für 2017.

9.6 Erklärung nach §2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 der Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Endothelialisierung polymerer Gasaustausch-Hohlfasermembranen und konsekutive Analyse der Membranbesiedlung unter dynamischen Bedingungen

in den Leibniz-Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO) der Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie (HTTG) unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. h. c. Axel Haverich und mit der Unterstützung durch Dr. Bettina Wiegmann ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

(U. Zwirner)
Hannover, den 24.04.2017

9.7 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Axel Haverich, für seine Idee der Biohybridlunge und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe an diesem Projekt forschen zu dürfen. Auch meiner Betreuerin, Frau Dr. Bettina Wiegmann, danke ich sehr für ihre umfangreiche Vorarbeit auf dem Gebiet der Hohlfasermembran-Endothelialisierung, die zur Verfügung gestellten Methoden, Materialien und Geräte sowie ihre hilfreichen Anregungen bei der Planung und Durchführung der Experimente. Dank gebührt außerdem Herrn Dr. Christian Hess, der mir nicht nur viele Prinzipien des wissenschaftlichen Arbeitens vermittelte, sondern mich selbst über sein Ausscheiden aus der Arbeitsgruppe hinaus beim Verfassen des Manuskripts unterstützt hat.

Herrn Professor Ulrich Martin und den Mitarbeitern aus dem LEBAO danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Laboratorien und die inspirierende Arbeitsatmosphäre. Gern erinnere ich mich an die stets hilfsbereite Zusammenarbeit mit den damaligen Kollegen aus der AG Biohybridlunge (Dres. Pflaum, Beckmann, Stiefel) und an manche Diskussion bei einer Tasse Kaffee. Frau Rita Kemkes bin ich für ihre Einführung in die praktische Labortätigkeit dankbar; ebenso danke ich Frau Jennifer Wolf für ihre Unterstützung in der Zellkultur.

Von Seiten der HBRS habe ich nicht nur finanzielle, sondern vor allem ideelle Unterstützung erhalten, für die ich ebenfalls dankbar bin. An dieser Stelle möchte ich neben Frau Dr. Susanne Kruse vor allem Herrn Professor Reinhold Förster aus der Immunologie erwähnen, und wünsche alles Gute für die weitere Zukunft des StrucMed-Programms.

Besonderer Dank gebührt natürlich den Korrektoren meines Manuskripts für ihren Zeitaufwand und die zahlreichen Anregungen: Frau Dr. Bettina Wiegmann, Herrn Dr. Michael Pflaum, Herrn Dr. Christian Hess, Frau Dr. Mirja Koy, Herrn Dr. Tammo Lüßenhop, Frau Laura Niebling, Frau Professorin Patricia Virsik-Köpp sowie insbesondere Herrn Professor Martin Ptok, der die Entstehung dieses Textes in alles andere als selbstverständlicher Weise durch kritische Rückfragen bereichert hat.

Last but not least danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung während der Studienzeit sowie allen Freunden in nah und fern, die über die letzten Jahre selbst zu den unmöglichsten Uhrzeiten ein offenes Ohr hatten – nicht nur in fachlichen Dingen. Vielen Dank!