



Tissue Engineering of blood vessels

State of the art

Bakkelauriats-Arbeit

aus

KO „Angewandte Physiologie“

bei

Prof. Dr. Lametschwandtner

Studentin:

Name: HAINZ Astrid

Matr.Nr.: 0822050

Sommersemester 2011



Inhalt

<u>EINLEITUNG.....</u>	<u>3</u>
<u>TISSUE ENGINEERING VON BLUTGEFÄSSEN.....</u>	<u>3</u>
DAS PRINZIP VON TISSUE ENGINEERING VON GEFÄSSEN	4
<u>ANATOMIE VON BLUTGEFÄSSEN</u>	<u>6</u>
<u>MATERIAL</u>	<u>7</u>
ZELLQUELLEN.....	7
AUTOLOGE ENDOTHEL- UND MUSKELZELLEN.....	7
ALLOGENE ENDOTHEL- UND MUSKELZELLEN.....	7
STAMMZELLEN.....	7
ANDERE ZELLTYPEN.....	9
SCAFFOLDS.....	9
SCAFFOLDS AUS NATÜRLICHEN PROTEINEN (NATURAL PROTEIN SCAFFOLDS)	10
BIOLOGISCH ABBAUBARE POLYMER SCAFFOLDS.....	11
DEZELLULARISIERTE GEFÄSSE.....	11
ANDERE MATERIALIEN.....	12
<u>METHODEN DES CELL-SEEDING</u>	<u>12</u>
BESTIMMUNG DER SEEDING-EFFIZIENZ	13
BESTIMMUNG DER ZELLVITALITÄT.....	14
CELL-SEEDING – METHODEN.....	15
PASSIVE SEEDING.....	15
STATISCHES SEEDING MIT BIOLOGISCHEM KLEBER.....	16
DYNAMISCHES CELL SEEDING.....	16
ROTATION-SYSTEME.....	16
VAKUUM-SYSTEM.....	17
SHEET-BASED-SEEDING.....	17
ELEKTROSTATISCHES CELL SEEDING.....	18
MAGNETISCHES CELL SEEDING.....	19
PHOTOPOLYMERISIERENDE HYDROGELE.....	19
HYBRIDSYSTEME	20
<u>HILFSMITTEL</u>	<u>22</u>
<u>KLINISCHE ANWENDUNGEN.....</u>	<u>22</u>
<u>DISKUSSION UND AUSBLICK.....</u>	<u>22</u>
<u>QUELLEN.....</u>	<u>25</u>

Einleitung

Leider werden in unserer Gesellschaft der aortokoronare Bypass, sowie jener in der Peripherie immer wichtiger und häufiger angewandt. Verschiedene Krankheitsbilder, aber auch die veränderten Ernährungsbedingungen in den europäischen und us-amerikanischen Industriestaaten in einer Überflusgesellschaft, führen vermehrt zu Gefäßverkalkung und schlussendlich zu Gefäßverschlüssen. Mittlerweile ist die Medizin soweit, dass sie diese verstopften Gefäße mittels Bypass umgehen kann. Die Frage ist somit: Womit wird der Bypass gelegt? Wenn keine körpereigene Vene verwendet werden kann muss eine Prothese eingesetzt werden. Diese Variante ist aber aus verschiedensten Gründen nicht immer die beste.

Tissue Engineering ist eine Methode, die versucht Blutgefäße künstlich wachsen zu lassen um sie danach als Ersatzgefäß in das Individuum zu transplantieren. Vergleicht man die Bypass-Problematik mit einem Straßennetz, so wäre die Prothese vergleichbar mit einer Umleitung auf eine Schotterstraße, auf welcher man schlecht aber doch ans Ziel kommt. Das Prinzip des *Tissue Engineering* konzentriert sich darauf eine möglichst äquivalente, asphaltierte Straße zu legen, die auch mit der Umgebung abgestimmt ist.

In dieser Arbeit soll das *Tissue Engineering* näher beleuchtet werden und die einzelnen im Moment verfügbaren Materialien und Methoden miteinander verglichen werden.

Einige Ausdrücke bezüglich dieser Thematik wurden im Englischen belassen. Das sind unter anderem „Tissue Engineering“, „Scaffold“, „(Cell-) Seeding“ sowie „Smooth muscle cell (SMC)“ und „Endothelcell (EC)“.

Tissue Engineering von Blutgefäßen

Dieses Kapitel soll nur einen groben Überblick über die Methodik des *Tissue Engineering* geben. Einzelne Methoden und die Materialien dazu werden in späteren Kapiteln behandelt.

Tissue Engineering bedeutet übersetzt etwa soviel wie „Gewebekonstruktion“ oder „Gewebezüchtung“. Das Ziel davon ist voll funktionsfähige Gewebe künstlich herzustellen und schließlich in einen Körper zu transplantieren. Durch diese Methode könnten das Einsetzen von Prothesen oder körpereigenen Venen weitgehend umgangen werden.

Denn körpereigene Venen können nicht immer verwendet werden, da sich oft verschiedene Probleme beim Suchen einer geeigneten Vene auftun. Bei über 10 % der Patienten kann kein autologer Gefäßersatz verwendet werden, da die Gefäße aufgrund von Trauma, Krankheiten oder früheren chirurgischen Eingriffen geschädigt sind (ZHANG *et al.* 2007).

Durch diese Probleme sind Ärzte gezwungen auf künstliche Venen zurück zu greifen. Diese stellen als Prothese einen Fremdkörper des Patienten dar und bergen oft Probleme wie Stenosen, Thromboembolisation, Calciumablagerungen oder Infektionen. Diese Probleme treten speziell im kleinen Maßstab von unter 6 mm auf. Darüber hinaus sind künstliche Gefäßprothesen statisch und wachsen nicht mit dem Körper mit. Besonders bei Kindern ist dieser Aspekt wichtig (ZHANG *et al.* 2007).

Das Prinzip von Tissue engineering von Gefäßen

Für *Tissue Engineering* werden verschiedene Zelltypen verwendet. Die erste Unterscheidung dieser Zellen bezieht sich auf den Spender der Zellen. Bevorzugt werden autologe Zellen verwendet. In diesem Fall ist der spätere Empfänger des Gewebes auch gleichzeitig der Spender und bei einer Rücktransplantation wird keine Immunantwort des Körpers hervorgerufen. Vom Empfänger können adulte Stammzellen, Gefäßzellen aber auch andere Zelltypen wie z.B. Fibroblasten einer Haut-Biopsie (L'HEUREUX *et al.* 2006) verwendet werden.

Das Gegenstück zu autologen Zellen sind allogene Zellen. Hier sind Spender und Empfänger zumindest von derselben Art. Allerdings stellt bei einer solchen Transplantation die Immunantwort des Körpers ein großes Risiko dar. Als allogene Zellen können Gefäßzellen, embryonale Stammzellen und Nabelschnurblutzellen verwendet werden.

Die Zellen werden kultiviert und anschließend auf ein biologisch abbaubares Gerüst (engl. Scaffold) ausgesät. Daraufhin erfolgt die Kultivierung auf dem *Scaffold*. Je

nach Methodik des Aussäens und nach Zelltyp variiert die Kultivierungszeit zwischen wenigen Stunden und mehreren Tagen. Erfolgt diese Kultivierung *in vitro*, geschieht dies in einem *vessel reactor*, einem Bioreaktor, welcher die physiologische Umgebung der Blutgefäße nachahmt. Das beschränkt sich aber nicht nur auf Temperatur, Nährmedium und Luftfeuchtigkeit wie es in einem Inkubator der Fall ist. Die Zellen werden auch mechanischen Reizen ausgesetzt und von Wachstumsfaktoren unterstützt.

Ziel dieser Kultivierung ist, die ausgesäten Zellen zu einem zylindrischen Blutgefäß wachsen zu lassen, was den *Scaffold* überflüssig und abbaubereit macht und gleichzeitig alle erforderlichen Eigenschaften eines Blutgefäßes mit sich bringt. Blutgefäße sollten nicht thrombogen und nicht immunogen sein, sowie dem Blutfluss – der in arteriellen Gefäßen sehr hoch ist – standhalten, aber auch ein gewisses Maß an Elastizität aufweisen können.

Ist dies gelungen, so erfolgt die Transplantation in den Körper.

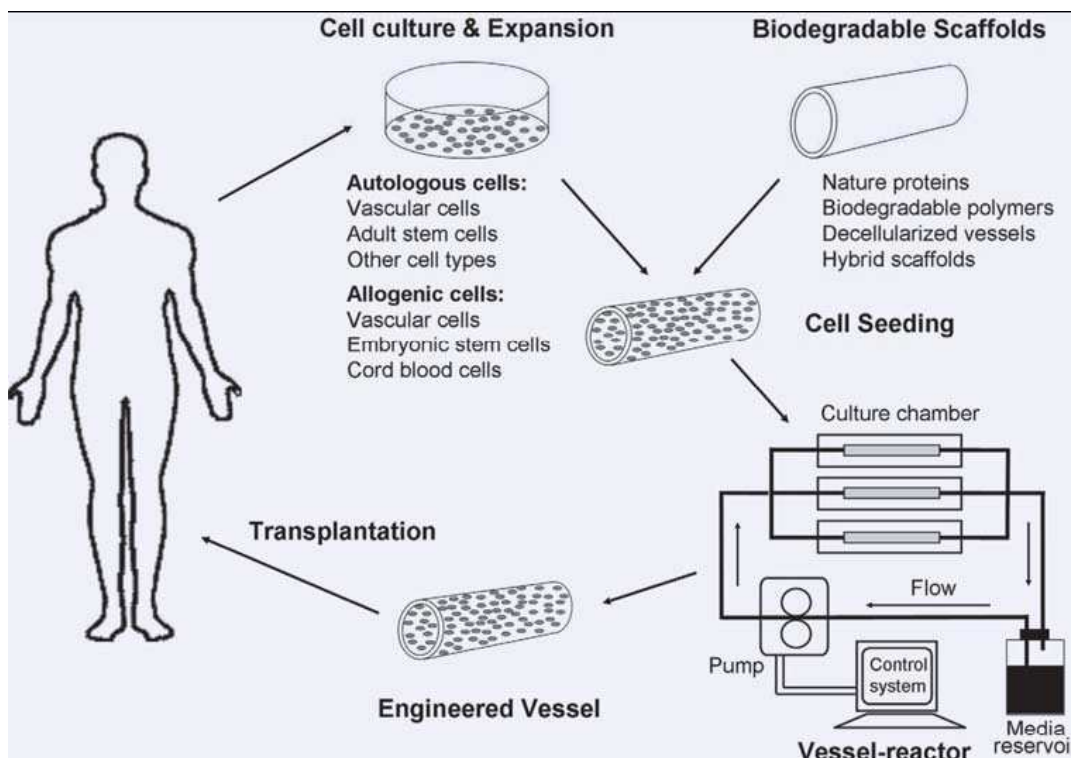


Abb. 1: Schematische Darstellung von *Tissue Engineering* eines Blutgefäßes *in vitro*. Die Zellen werden nach ihrer Kultivierung auf einen Scaffold ausgesät und in einem „vessel reactor“ zu einem Gefäß kultiviert. Danach erfolgt die Transplantation in den Körper des Individuums (ZHANG W.J. et al. 2007).

Anatomie von Blutgefäßen

Um zu wissen wie *Tissue Engineering* funktioniert und die Methodik zu verstehen ist die Kenntnis der Anatomie von Blutgefäßen notwendig. Da dies eine Abhandlung über *Tissue Engineering* ist, wird hier nur kurz auf die wichtigsten Merkmale eingegangen.

Die Wand von Arterien und Venen besteht aus drei verschiedenen Schichten.

1. Intima (*Tunica interna* oder *Tunica intima*)
2. Media (*Tunica media*)
3. Adventitia (*Tunica externa* oder *Tunica adventitia*)

Je nach Blutgefäßtyp variiert die Stärke und Dicke dieser Schichten.

Die Intima besteht aus Endothelzellen die das Gefäßlumen begrenzen und den Gas- und Flüssigkeitsaustausch regeln. Die Endothelzellen liegen in einreihiger Lage und bei Arterien in Längsrichtung des Gefäßstromes. Häufig liegt zwischen der Intima und der Media die Membrana elastica interna. Sie besteht aus einer dünnen Bindegewebsschicht. Bei Arterien kommen in ihr mehr elastische Fasern vor als in den Venen. Draufhin folgt die Media. Die Media besteht aus einer mehr oder weniger ausgeprägten Muskelschicht. Bei Arterien ist die Tunica media für die Weite des Lumens und die Produktion von extrazellulärer Matrix verantwortlich. Bei großen Arterien ist die Media die stärkste Schicht. Die Muskelfasern haben die Aufgabe, dem Druck (Blutdruck) im Gefäß standzuhalten und ihn zu regulieren. In Venen gleicht der Aufbau dem der Arterien, allerdings haben Venen eine viel dünnere Muskelwand als Arterien. Die Adventitia ist das umgebende lockere Bindegewebe zur Verankerung und Einbettung des Blutgefäßes in seiner Umgebung (anatomie-online.com, 2010).

Bei größeren Gefäßen enthält die Adventitia feine Blutgefäße zur Versorgung der Gefäßwand (Vasa vasorum). Bei kleineren Blutgefäßen erfolgt die Versorgung aus dem Lumen des Gefäßes selbst. Vor allem die Endothelzellen und die Muskelschicht spielen eine sehr wichtige Rolle beim Funktionieren von Gefäßzellen. Während die Endothelzellen selektiv permeabel sind (z.B. für Gas durchlässig, aber nicht für Thrombocyten), haben die Muskelzellen eine sekretorische Aufgabe. z.B. werden

Kollagenfasern, elastische Fasern oder Proteoglykane (glykolisierte Glykoproteine) abgesondert und sorgen für die Elastizität (anatomie-online.com, 2010).

Material

Zellquellen

Autologe Endothel- und Muskelzellen

Autologe Zellen sind immer die erste Wahl, da sie keine Immunantwort des Körpers bei der Rücktransplantation hervorrufen. Sie werden auch von sehr vielen Forschungsgruppen für *Tissue Engineering* verwendet. Allerdings haben diese Zellen ein limitiertes Potential zur Proliferation, was eine Kultivierung erschwert. Durch diesen Umstand besteht auch das Risiko, dass die Zellen in vitro ihre Funktion verlieren würden. Eine Möglichkeit dem entgegen zu wirken ist Genmanipulation. Mckee et. al. (2003) induzierten „human telomerase revers transcriptase subunit“ (hTERT) in menschliche Gefäßmuskelzellen. Dieselbe Methode wurde auch von Shao et al. (2004) bei den Endothelzellen angewandt. Die genmanipulierten Zellen proliferierten weit über ihre normale Kapazität hinaus. Allerdings ist die Sicherheit von genmanipulierten Zellen v.a. bei der Transplantation in den menschlichen Körper ein großer Streitpunkt (ZHANG *et al.* 2007).

Allogene Endothel- und Muskelzellen

Hier ist das größte Problem noch immer die Immunreaktion des Körpers auf die fremden Zellen. Vor allem die Endothelzellen, welche direkt mit dem Blut in Kontakt kommen reagieren mit einer Immunantwort (ZHANG *et al.* 2007).

Stammzellen

Embryonale Stammzellen

Stammzellen wurden in den letzten Jahren die Haupt-Zellquelle für *Tissue Engineering*. Embryonale Stammzellen haben gegenüber adulten den Vorteil, dass sie in alle Zelltypen differenzierbar sind. Durch die Fähigkeit sich selbst zu erneuern

ist eine größere Ausbeute an Zellen möglich, als bei bereits differenzierten Zellen. (ZHANG W.J. *et al.* 2007)

Experimente mit Stammzellen wurden bis jetzt v.a. an Mäusen gemacht. So wurden Mäusestammzellen zu Endothelzellen differenziert und danach mit hTERT behandelt, was das Proliferationspotential steigerte. Diese Zellen zeigten einen normalen Phenotyp, konnten eine tubuläre Struktur formen und exprimierten auch verschiedene Faktoren, welche bei der Gefäßbildung eine Rolle spielen (Flk-1 (fötal liver kinase-1), von Willebrand – factor, basic fibroblast factor und Erythropoetin). Dies ist nur ein Experiment von vielen, das zeigt, dass embryonale Stammzellen eine gute Quelle für *Tissue Engineering* sind. Allerdings wurden sie noch nie im klinischen Bereich eingesetzt. Die Hauptprobleme sind die immunogenen und tumorigenen Probleme, sowie ethische Probleme (ZHANG *et al.* 2007).

Adulte Stammzellen

Bei adulten Stammzellen kann das Problem der Immunreaktion und der ethischen Probleme umgangen werden, da die Zellen aus dem Patienten selbst kommen. Ebenso sind sie bereits in eine bestimmte Linie differenziert und haben keine tumorigene Kapazität mehr. Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) können proliferieren, migrieren und in reife Endothelzellen differenzieren. Sie können in bis zu 20 Passagen gesplittet werden ohne ihr Potential zur Differenzierung zu verlieren. Sie befinden sich im Knochenmark und von Wachstumsfaktoren stimuliert, migrieren sie und gelangen in die peripheren Blutbahnen. Ebenso können EPCs aus dem Nabelschnurblut gewonnen werden. Experimente wurden beispielsweise an Schafen gemacht, wo das Gewebe 130 Tage im Organismus funktionsfähig blieb und die Fähigkeit zur Kontraktion und Relaxation ausbildete (ZHANG *et al.* 2007).

Ebenso fand man heraus, dass Mesenchym-Stammzellen aus dem Knochenmark in Muskelzellen der Gefäße (Smooth muscle cells, SMC) der Media differenzieren können. Nachgewiesen wurde dies von Cho *et al.* (2005) durch folgendes Experiment: Aus Hunden wurden aus dem Knochenmark abgeleitete ECs und SMCs genommen und kleine Gefäße *in vitro* konstruiert. Das Gewebe blieb 8 Wochen lang in der Halsschlagader des Hundes und war mit einem fluoreszierenden Farbstoff

versehen. Daraus war ersichtlich, dass diese abgeleiteten Knochenmarkzellen auch bei der Gefäßerneuerung mitwirken (ZHANG *et al.* 2007).

Eine weitere Zellquelle von adulten Stammzellen ist Fettgewebe. In Experimenten von Kern *et al.* (1983) überlebten diese Zellen aus menschlichem Fettgewebe mehrere Passagen. Weiters isolierte Zuk *et al.* (2001) multipotente „adipose derived stromal cells“ (ADSCs) aus Fettgewebe. Diese Zellen können in Fettzellen, Osteoblasten und Muskelzellen differenzieren. Zhang *et al.* (2007) isolierte ADSCs aus Lipoaspirat¹ und fand heraus, dass diese eine Differenzierung zu SMC veranlassen konnten. Sowohl bei Knochenmark- als auch bei Fettgewebezellen ist die Herausforderung die, eine Differenzierung in andere Zelltypen zu unterbinden und nur jene in Muskelzellen zuzulassen (ZHANG *et al.* 2007).

Andere Zelltypen

Wie schon erwähnt sind Stammzellen die Hauptzellquelle für *Tissue Engineering*. Allerdings bewiesen Experimente von L'Heureux *et al.* (2006) dass auch andere Zelltypen für Tissue engineering geeignet sind. L'Heureux *et al.* (2006) benutzte menschliche Fibroblasten einer Hautbiopsie um Blutgefäße herzustellen, welche dann auch in Tiermodelle auf ihre Funktionsfähigkeit getestet wurden. Die Blutgefäße waren antithrombogen und für 8 Monate *in vivo* mechanisch stabil. Eine histologische Analyse zeigte zudem, dass sich innerhalb der Blutgefäße eine „smooth muscle“-spezifische α -actin-positive Zellpopulation entwickelte. Auch andere Experimente waren erfolgreich. Allerdings wurde dieses Verfahren noch nie an Menschen getestet (ZHANG *et al.* 2007).

Scaffolds

Unerlässlich für *Tissue Engineering* ist das Gerüst – der *Scaffold*. Es soll die Zellen beim Wachsen, der Migration und der Differenzierung unterstützen. Er hat sowohl eine nutritive, als auch eine wegweisende Funktion für die Zellen. Neben diesen Fähigkeiten muss ein *Scaffold* auch einer mechanischen Belastung stand halten können, um in einer *in vivo*-Kultivierung keinen Schaden durch Blutdruck zu erleiden

¹ Lipoaspirat: reines Fettgewebe, welches ein Nebenprodukt der plastischen Chirurgie darstellt.

bis sich SMCs und ECs zu einem lebensfähigen Gefäß gebildet haben (PANKAJAKSHAN, AGRAWAL, 2010).

Idealerweise wird der *Scaffold* in der Kultur langsam von den Zellen in der Kultur oder nach der Transplantation resorbiert, sodass ausschließlich das zu transplantierende Zellgewebe übrig bleibt (ZHANG, *et al.* 2007).

Es gibt verschiedene Ansätze ein *Scaffold* zu konstruieren:

- natürliche Proteine
- Synthetische Polymere
- dezellularisierte Gefäße

Scaffolds aus natürlichen Proteinen (Natural protein scaffolds)

Natürliche Proteine wie Kollagen, Elastin und Fibronectin sind die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix im Körper. Sie sind die beste Wahl um Zellen an beliebigen Oberflächen anzuheften und Zellsignale sicherzustellen. Allerdings haben diese Stoffe auch ihre Schwächen. Kollagenfasern bringen nicht die nötige Stärke mit um in der hämodynamischen Umwelt bestehen zu können. Erst gestärkt durch ein „Maschendrahtsystem“ unter der Anwendung von Glykation² kann diese Schwäche behoben werden. Die Maschen dienen als Lücken, in welchen sich die Zellen festsetzen konnten. Um den *Scaffold* stabil zu machen, wurde er in Dacron[®]-Maschen oder Polyurethane gewickelt (ZHANG *et al.* 2007).

Weiters wurde mit Mikro- und Nanostrukturen von Kollagen und Elastin experimentiert. Diese konnten dem erhöhten Druck in den Blutgefäßen stand halten. Long und Tranquillo setzten 2003 ein, auf Fibrin-*Scaffold* basierendes Gefäß in die Halsschlagader eines Lammes ein und beobachteten es 15 Wochen lang. Es zeigte die Stärke und Reaktionsfreudigkeit von einem nativen Blutgefäß (ZHANG *et al.* 2007).

² Glykation oder Glykierung: Prozess bei dem Kohlenhydratgruppen an Proteine oder Lipide ohne Beteiligung von Enzymen gehängt werden

Biologisch abbaubare Polymer Scaffolds

Diese Gerüste sind billiger und leichter zu bekommen. Darüber hinaus sind sie untereinander besser kombinierbar. Ein beliebter Stoff ist PGA (Polyglycolic acid). Blutgefäße mit diesem Gerüst wurden auch schon von Niklason *et al.* (1999) *in vivo* transplantiert. Obwohl PGA eine gute Verträglichkeit in biologischen Systemen aufwies hat es auch eine Schattenseite: Die Zersetzungsprodukte dieses Stoffes sind sauer und können Entzündungen hervor rufen. Darüber hinaus stellten Higgens *et al.* (2003) fest, dass PGA die Differenzierung der Zellen, sowie die Mitose behindert. Ebenso zerfällt es sehr rasch, was auf die geringe mechanische Belastbarkeit zurück zu führen ist (ZHANG *et al.* 2007).

Andere synthetische Polymere mit einer niedrigeren Zerfallsrate wurden daraufhin ebenso getestet. Darunter befanden sich Poly-(L-lactic acid) (PLLA), das Co-Polymer of Poly-(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA), Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB) und das Co-Polymer von PGA und Polyhydroxyalkanoate (PHA). Ihre Biokompatibilität wurde durch physikalische oder chemische Oberflächenmodifikation verbessert. Allerdings braucht es hier noch Langzeitstudien um die Toxizität der Zerfallsprodukte genau fest zu stellen (ZHANG *et al.* 2007).

Dezellularisierte Gefäße

Dies sind Gefäße aus denen die zelluläre Matrix mittels Detergenzien, Inhibitoren, Enzymen und Puffern entfernt wurde. Übrig bleibt nur extrazelluläres Gewebe, in welches sich die kultivierten Zellen einnisten sollen.

Teebken *et al.* (2000) und Amiel *et al.* (2006) versuchten dies mit menschlichen Zellen auf einer dezellularisierten Schweineaorta. Teebken *et al.* (2000) säten ECs und Myofibroblasten der *Vena saphena magna* aus und bekamen stabile Gewebe, welche dem mechanischen Druck stand hielten. Amiel *et al.* (2006) versuchten dies mit ECs aus der menschlichen Nabelschnurvene und mit SMCs aus menschlichen Gefäßen. Allerdings schlug dieser Versuch fehl, da die Matrix für die ausgesäten Zellen zu eng war, als dass sie sich einnisten konnten (ZHANG *et al.* 2007).

Um dieses Problem zu umgehen stellten Simionescu *et al.* (2006) „pure-elastin-scaffolds“ und „pure-collagen-scaffolds“ her. Die jeweils andere Komponente wurde

entfernt. So sollte das Gerüst eine porösere Oberfläche bieten. Dieser Versuch war erfolgreich. Es gelang nicht nur die Kultivierung der Zellen, sondern es wurden auch neue Elastinfasern auf dem Kollagengerüst und umgekehrt gefunden. Das belegt, dass die Zellen auch in der Kultivierung zur Synthese dieser Stoffe fähig sind. (ZHANG *et al.* 2007)

Bei diesen Methoden muss aber definitiv noch geklärt werden, inwiefern tierische Pathogene auf den menschlichen Körper wirken. Eine gute Alternative dazu wären dezellularisierte, menschliche Nabelschnurgefäße, wie Daniel *et al.* (2005) mit einer dezellularisierten Nabelschnurvene, welche eine optimale Oberfläche für die Zellen und die mechanischen Eigenschaften einer nativen Vene bietet, bewiesen.

Andere Materialien

Um die Schattenseiten der *Scaffolds* aus natürlichen Protein und jenen aus synthetischen Polymeren zu umgehen wurden Hybridmaterialien aus natürlichen Proteinen und synthetischen Polymeren entwickelt und getestet. Li *et al.* (2006) entwickelte einen *Scaffold* aus co-elektrogesponnenen PLGA, Gelantine und α -Elastin. Stitzel *et al.* (2006) dagegen mischte co-elektrogesponnenen PLGA mit Typ-1-Collagen und Elastin. Es wurden keine toxischen Effekte bemerkt und eine Kombination aus natürlichen Proteinen und synthetischen Polymeren könne eine gute Basis für das *Tissue Engineering* sein (ZHANG. *et al.* 2007).

Methoden des Cell-seeding

Über die Zeit haben sich verschiedene Methoden des *Cell-seeding* entwickelt. Allerdings konnte sich keine davon als den anderen überlegen heraus kristallisieren. Im folgenden Kapitel werden verschiedene Methoden einander gegenüber gestellt.

Allerdings sind auch die Methoden für die quantitative Bestimmung der *Seeding*-Effizienz sehr zahlreich, was ein Problem beim Vergleichen der einzelnen *Cell-Seedin*-Techniken darstellt (VILLALONA *et al.* 2010).

Grob können diese Techniken in Beobachtung und manuellem Zählen oder indirekte Quantifizierung durch eine Probennahme, von der eine spezielle Funktion von

metabolisch aktiven Zellen gemessen werden kann, eingeteilt werden. Allerdings kann bei der Beobachtung nur die Oberfläche gesehen und nicht die Penetration der Zellen in den *Scaffold* bestimmt werden. Durch die indirekte Quantifizierung einer Probennahme können alle lebenden Zellen gemessen werden. Gleichzeitig wird eine Zählung toter Zellen vermieden. Ebenso ist die Analyse schneller. Allerdings birgt eine Probennahme immer eine größere Fehlerquelle (VILLALONA *et al.* 2010).

Bevor die Methoden des *Cell Seedings* selbst verglichen werden, sollte zuerst ein Blick auf die Bestimmungsmethoden der *Seeding* - Effizienz und der Zellvitalität nach dem Aussäen betrachtet werden.

Bestimmung der Seeding-Effizienz

Haemocytometer

Bei dieser Methode werden die übrig gebliebenen Zellen nach dem Aussäen gezählt. Diese Methode ist zwar relativ einfach und schnell, aber auch sehr ungenau (VILLALONA *et al.* 2010).

Quantitative Histologie

Ein Stück des besäten *Scaffolds* wird geschnitten und mit speziellen Zellmarkern gefärbt. Unter einem Mikroskop können nun die Zellen gezählt werden. Diese Methode ist präziser als der Haemocytometer, allerdings auch sehr zeitintensiv (VILLALONA *et al.* 2010).

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Der Vorteil einer REM-Analyse ist, dass alle Zellen auf der Oberfläche des *Scaffolds* gezählt werden können. Darin liegt aber auch gleichzeitig ihr Nachteil: Es können eben nur die Zellen an der Oberfläche gezählt werden, aber nicht jene, die in den *Scaffold* penetriert haben (VILLALONA *et al.* 2010).

Picogreen (DNA) - Ermittlung

Bei dieser Methode wird die DNA des gesamten Gewebes in einem geschnittenen *Scaffold* mittels Ultraschall gemessen. Dazu ist eine Standardkurve notwendig – welche dann als Korrelation zur gemessenen Kurve steht. Diese Methode ist sehr genau, allerdings nur bei denselben Zell-Linien und *Scaffolds* (VILLALONA *et al.* 2010).

Zellen auszählen mit

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide) and MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)

Messung der Stoffwechsel-Aktivität um die Zellvitalität festzustellen.

Diese Methode misst die zelluläre Stoffwechselaktivität durch Feststellung der enzymatischen Reaktion in den Mitochondrien (VILLALONA *et al.* 2010).

WST-1 (4-(3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzenedisulfonate) misst die Stoffwechselaktivität lebender Zellen, ihre Proliferation oder die Cytotoxizität und basiert auf der Reduktion von WST-1 durch lebenden Zellen (VILLALONA *et al.* 2010).

Quantification Methods Used in Cell Seeding

Methods	Advantages	Disadvantages
Hemocytometer	Simple, fast	Not accurate, overestimates cell seeding
Histology	Real counting, best overall	Tedious, time consuming, good different cell lines if labeled
SEM	Scaffold surface analysis	Only good for scaffold surfaces
DNA	Accurate, reliable	Changes when comparing different cell lines or different donor
MTS, MTT, WST-1	Quantitative and qualitative	Changes when comparing different cell lines or different donor

Tab.1.: Vergleich der verschiedenen quantitativen Mess-Methoden (VILLALONA *et al.* 2010)

Bestimmung der Zellvitalität

Die Zellvitalität muss festgestellt werden um sicher zu gehen, dass 1. die Zellen fest am *Scaffold* sitzen und 2. dass sie die Fähigkeit haben ein Gefäß herzustellen.

MTT – Probe

Durch Absorption wird die Menge an gespaltenem Substrat festgestellt. Diese Spaltung findet nur in den Mitochondrien statt und ist daher ein Indiz für lebensfähige Zellen. Dieser Test kann aber ebenso mit MTS und WST-1 durchgeführt werden (VILLALONA *et al.* 2010).

Live-Dead -Probe

Hier werden die Zellen zuerst mit Calcein-AM/Ethidium-Homodimer – Färbung angefärbt und danach mit einem konfokalen Mikroskop als lebensfähig (grün) oder als tot (rot) identifiziert (VILLALONA *et al.* 2010).

Cell-Seeding – Methoden

Passive seeding

Dies ist die simpelste und am weitest verbreitete Methode des *Tissue Engineerings*. Die Zellsuspension wird direkt in das Lumen des *Scaffolds* oder darauf pipettiert und danach für einige Minuten inkubiert. Danach erfolgt eine weitere Inkubation in einer Petri-Schale für weitere Stunden oder Tage. Dies soll eine bessere Anhaftung der Zellen an den *Scaffold* gewährleisten. Die *Seeding*-Effizienz liegt bei 10 – 25 % (VILLALONA *et al.* 2010).

Wie gesagt ist diese Methode sehr einfach durchzuführen. Allerdings bringt sie auch erhebliche Nachteile mit sich: Erstens ist es schwierig eine einheitliche Oberfläche an ECs zu bekommen, da der besäte *Scaffold* gedreht oder die Kultivierungszeit verlängert wird. Zweitens müssen andere Zellen wie zum Beispiel SMCs in den *Scaffold* penetrieren. Dabei hängt die Erfolgchance sehr vom *Scaffold*material und dessen Porosität ab. Drittens können sich die Zellen durch eine kurze Inkubationszeit (weniger als 2 Stunden) nicht richtig entwickeln, was zur Folge hat, dass bei der Implantation Zellen ausfallen können. Zwar kann dieses Risiko mit einer längeren Inkubationszeit umgangen werden. Doch birgt das wiederum eine erhöhte

Kontaminationsgefahr oder ungewünschte Zellveränderungen (VILLALONA *et al.* 2010).

Statisches Seeding mit biologischem Kleber

Bei dieser Methode wird der *Scaffold* mit einem kommerziell erhältlichen biologischen Kleber ummantelt. Das dient der verbesserten Anhaftung der Zellen an den *Scaffold* oder der Matrix. Am häufigsten wird dafür Fibronectin verwendet. Andere verwendete Stoffe sind Fibrin, Kollagen, Laminin und Plasma. Ein anderer Zugang zu dieser Thematik ist, nicht vollständige biologische Kleber anzuwenden sondern spezifische Liganden, die auf bestimmte Zelltypen ansprechen. Ein Beispiel sind „Biomimetic Surfactant Polymere“, die von der heparinbindenden Domäne des Fibronectins abgeleitet sind. Diese Liganden verbessern die EC-Anhaftung sowie auch das Wachstum der Zellen (VILLALONA *et al.* 2010).

Ein großer Nachteil dieser Methode ist aber das erhöhte Thromboserisiko. Wenn der biologische Kleber nicht die gesamte Oberfläche des *Scaffolds* abdeckt, können sich an den frei gebliebenen Stellen Blutplättchen ansammeln, die schlussendlich zur Verklumpung führen (VILLALONA *et al.* 2010).

Dynamisches Cell seeding

Dynamisches *Cell Seeding* gliedert sich in zwei Methoden auf. Das Rotations-System, welches auf hydrostatischen Kräften basiert und das Vacuum-System, das auf Druckunterschiede zurückzuführen ist. Mit beiden Methoden wurde die *Cell Seeding*-Effizienz, die Einheitlichkeit der Zellen und die Penetration in den *Scaffold* erhöht (VILLALONA *et al.* 2010).

Rotation-Systeme

Diese Methode beinhaltet mehrere verschiedene Systeme, welche aber alle auf demselben Prinzip basieren: Der *Scaffold* oder die Matrix wird in einer Zell- oder Mediumsuspension rotiert oder mit der gewünschten Suspension umspunnen. Bei den verschiedenen Systemen variieren dabei die Rotationsgeschwindigkeit (0,2 – 500

rpm) und die Kultivierungszeit (12 h – 72 h). Unter diesen Bedingungen konnte die *Seeding*-Effizienz von 38 % auf 90 % erhöht werden. „Centrifugal-Seeding“ - Systeme haben eine Rotationsgeschwindigkeit von bis zu 2500 rpm³. Bei ihnen ist eine höhere *Seeding*-Effizienz, als auch eine höhere Anzahl penetrierender Zellen das Resultat. Bei diesem Hochgeschwindigkeits-*Seeding* bleibt zwar die Zellvitalität bestehen, allerdings besteht Skepsis gegenüber den Auswirkungen der Geschwindigkeit auf die Zellmorphologie. Bei niedrigeren Geschwindigkeiten wurden hingegen keine Zellveränderungen festgestellt. Allerdings ist hier eine erhöhte *Seeding*-Dauer von Nöten, welche rund 24 h betragen kann (VILLALONA *et al.* 2010).

Vakuum-System

Cell Seeding mittels Druckunterschied-Systeme wurde seit Mitte der 1980er erforscht. Sie basieren auf den Unterschied von inneren und äußeren Druck, welcher die Zellen in den *Scaffold* pressen soll. Die Vorteile liegen bei einer hohen *Seeding*-Effizienz von 60 % - 90 % und in der Schnelligkeit dieser Methode. Ebenso sind die Vakuum-Apparate in der Regel verfügbare und die meisten leicht zu bedienen, was auch das Risiko einer Kontamination reduziert. Allerdings gab es bis jetzt keine *in-vivo*-Studien, welche die Skepsis bezüglich der Zellmorphologie und -Vitalität nach dieser Methode ausräumen könnten (VILLALONA *et al.* 2010).

Sheet-based-seeding

Für diese Methode wird kein Fremdmaterial in Form eines *Scaffolds* benötigt. L'Heureux *et al.* (1998) entwickelten eine Technik, bei der die Blutgefäßzellen auf ein Kulturmedium aufgetragen und danach für 30 Tage inkubiert wird um eine Zellschicht zu formen. Diese Zellschichten werden dann zu zylindrischen Gefäßen aufgewickelt und aneinander gestückelt (VILLALONA *et al.* 2010). Diese Methode wurde bei Dialysepatienten getestet. Die Zellen wurden *in vivo* „trainiert“ und gezüchtet. Bis zu 5 Monate nach der Implantation wurden keine Komplikationen bei den ersten drei Patienten beobachtet. (ZHANG *et al.*, 2007).

³ rpm = rotation per minute

Der Vorteil bei dieser Methode ist, dass autologe Zellen gezüchtet werden, die keine Unterstützung durch einen *Scaffold* brauchen. Außerdem kann dieses Gewebe sowohl als Vene, als auch als Arterie verwendet werden und es bringt die notwendigen mechanischen Fähigkeiten, sowie schon eine morphologische Zellreifung mit. Auch das thrombotische Risiko ist gesenkt. Somit werden auch keine gerinnungshemmenden Stoffe gebraucht, die das Ergebnis oder den Organismus selbst beeinträchtigen könnten. Das Problem bei dieser Methode ist die lange Entwicklungsdauer eines Gefäßes. L'Heureux *et al.* (1998) beschrieb ein Minimum von drei Monaten um ein Gefäß auf diese Weise herzustellen. Die Kultivierungszeit ist zwar vom jeweiligen Zelltyp abhängig, aber durch das zeitintensive Verfahren ist es unwahrscheinlich, dass diese Methode Standard wird (VILLALONA *et al.* 2010).

Elektrostatisches Cell Seeding

Diese Methode basiert auf den elektrostatischen Eigenschaften eines *Scaffolds*. Sie sollte folgende Probleme beim Aussäen von ECs bewältigen: Die morphologische Reifung vor der Implantation und das Haftenbleiben der Zellen nach der Implantation. An einen negativ geladenen Polytetrafluoroethylene-*Scaffold* wird kurzfristig eine positive Spannung angelegt. Dies erhöht erstens die Zellreifung und zweitens die Anheftung der ECs am *Scaffold*. Bei dieser Methode werden die Zellen nur 16 min lang belastet, doch die Seeding-Effizienz ist bis zu 90 %. Wie gesagt hat diese Methode die Vorteile, dass die Zellen schon vor der Implantation reifen und dass nach einer Woche die Zellanhaftung beibehalten wurde. Ebenso konnte ein verringertes Thrombosevorkommen nach dem Entfernen der elektrischen Spannung beobachtet werden. Diese Methode wies auch einen signifikanten Unterschied im Bezug auf akute Heilung der Probe selbst auf, denn die Migration der SMCs wurde reduziert was wahrscheinlich auch das Risiko einer Hyperplasie verkleinert. Allerdings ist diese Methode noch nicht ausreichend erforscht um Kurz- und Langzeiteffekte feststellen zu können.

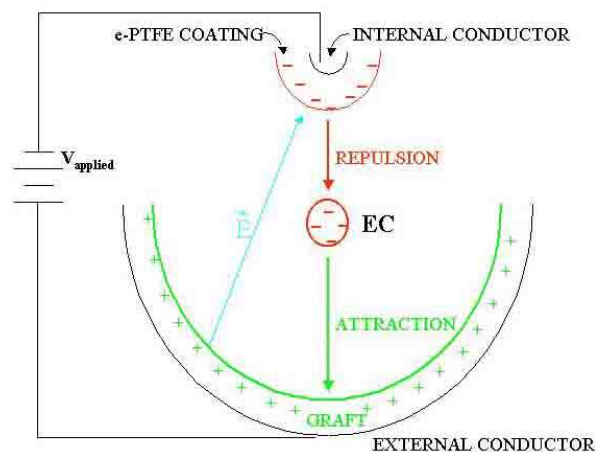


Abb. 2: Schematische Darstellung des elektrostatischen Cell Seeding. (bioscience.org)

Darüber hinaus sollte sie auch an anderen *Scaffolds* getestet werden (VILLALONA *et al.* 2010).

Magnetisches Cell seeding

Diese Seeding-Technik wird verwendet um die *Seeding*-Effizienz zu erhöhen. Grundsätzlich funktioniert Magnetisches *Cell Seeding* so: Mit einem Magnet werden Nanopartikel, die sich in oder auf der gewünschten Zelle befinden, in die richtige Richtung gezogen. Im Moment sind zwei verschiedene Methoden dafür populär. Die erste basiert auf superparamagnetische Mono-size-polymer – Partikel (Dynabeads®, DynaBiotec, Oslo, Norway), die spezifisch an die gewünschte Zelle binden. Danach werden die Zellen mit den Partikeln während des Aussäens kurzzeitig einem Magnetfeld ausgesetzt und danach 12 h inkubiert. Die Seeding-Effizienz liegt hier bei 99 % (VILLALONA *et al.* 2010).

Bei der zweiten Methode werden kationische Liposomen, die superparamagnetische Eisenoxid-Partikel enthalten in die Zellen eingeschleust. Danach werden diese präparierten Zellen auf einen *Scaffold* ausgesät, in dessen Lumen sich ein entfernbarer Magnet befindet. Dieses Aussäen dauert nur wenige Minuten, während die Kulturzeit 24 h beträgt. Danach ist die Seeding-Effizienz bei 90 % (VILLALONA *et al.* 2010).

Die Vorteile dieser Methode sind klar. Ein besäter *Scaffold* kann sehr schnell hergestellt werden und die Methode ist gut reproduzierbar. Allerdings wurde beobachtet, dass bei einer Partikelkonzentration von $>100 \mu\text{m}$ der kationischen Liposome pro Zelle und > 50 *beads* der Dynabeads-Technik pro Zelle die Proliferation beeinträchtigen. Darüber hinaus müssen vor den klinischen Versuchen Langzeitstudien und Studien über den späteren Verbleib der Partikel gemacht werden (VILLALONA *et al.* 2010).

Photopolymerisierende Hydrogele

Bei dieser Technik werden polymerisationsfähige Polythylenglycol-Derivate als Hydrogel-*Scaffolds* verwendet. Die Zellsuspension befindet sich in einer wässrigen

Monomerlösung. Bei einer Photopolymerisation führt das zu einem homogen besäten *Scaffold*. Kultiviert wird der besäte *Scaffold* dann entweder *ex vivo* oder *in situ* und zu diversen Strukturen geformt (VILLALONA *et al.* 2010). Vorteile dieser Methode sind erstens die Beeinflussung der Zellanhaftung, der Abbau des *Scaffolds* durch hydraulische oder enzymatische Prozesse und das Eluieren von Wachstumsfaktoren. Bis jetzt brachte diese Technik sehr gute *in vitro*-Ergebnisse hervor. Aber ihre Fähigkeit *in vivo*-Gefäße zu schaffen, die auch der hemodynamischen Umwelt standhalten muss sie erst noch unter Beweis stellen (VILLALONA *et al.*, 2010).

Hybridsysteme

Bei Hybridsystemen werden verschiedene Techniken miteinander kombiniert. Hier werden kurz zwei davon beschrieben.

Rotational vacuum seeding

Wie der Name schon sagt, vereint diese Methode das Rotations- und das Vakuumsystem in sich. Eine zylindrische Ausstülpung dient der Innenseite des Gefäßes als formgebend. Auf sie wird der *Scaffold* platziert und darauf das Medium mit den Zellen aufgetragen. Danach wird die Ausstülpung plus *Scaffold* und Zellen auf einen Gelenksarm in einer Vakuumkammer angebracht und für einige Zeit rotiert. Durch den Druckgradienten wird die Seeding-Effizienz erhöht, während das Rotieren dazu dient, die Zellen besser in den *Scaffold* penetrieren zu lassen. Wobei die *Seeding*-Effizienz sehr vom Material und Porösität des *Scaffolds* abhängt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Zellen sich über die gesamte Länge und Dicke des *Scaffolds* ausbreiten können. Der Nachteil ist allerdings, dass die Form des Gewebes an die Maschine und deren Ausstattung gebunden ist und daher nicht variabel ist. Wie bei allen kombinierten Systemen, erhöht sich auch bei dieser das Risiko, dass eine Technik aus der gesamten Kombination versagt. Je mehr Komponenten einfließen, desto höher wird auch die Fehlerquelle (VILLALONA *et al.* 2010).

Perfusionsbioreaktor-System

Ein Bioreaktor soll die physiologische Umgebung nachahmen. Nur unter diesen Bedingungen können die Zellen ihre gewünschte Morphologie erreichen, da die Form der Funktion folgt. Dies schließt auch Scherstress und mechanische Belastung und Anspannung mit ein. Diese mechanische Anspannung kann zur Verbesserung der mechanischen Leistung des Blutgefäßes führen – vergleichbar mit einem Fitnesstraining. Der Scherstress reiht die Zellen aneinander und verbessert die Anheftung und Vernetzung der Endothelzellen (ZHANG *et al.* 2007).

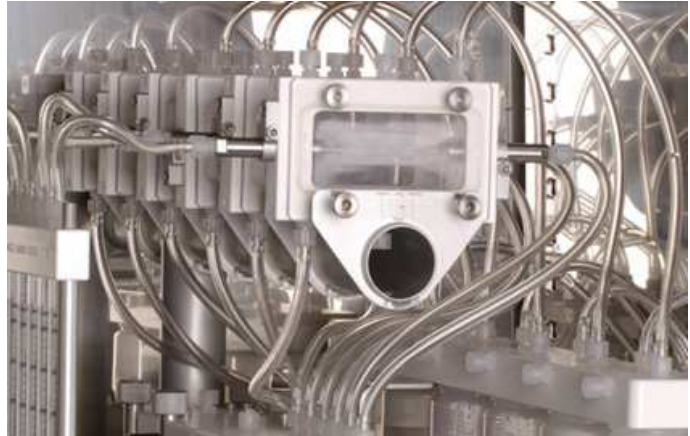


Abb. 3: In dieser Bioreaktorkammer werden tissue-engineerte Blutgefäße getestet. (.nrc-cnrc.gc.ca)

Es wurden verschiedene Bioreaktorsysteme entwickelt, welche Zellkultivierung und eine hohe Seeding-Effizienz vereinen. Allerdings benötigen diese Systeme eine lange Kulturzeit der Zellen, was die Gefahr einer Kontamination durch Bakterien oder Viren birgt. Nicht zu vergessen sind auch die benötigten xenogenetischen Seren, die den Weg zu einer klinischen Untersuchung dieser Methode verbauen (VILLALONA *et al.* 2010).

Abschließend muss noch erwähnt werden, dass die Mechanismen, welche die Zellen zu einer Gefäßformung veranlassen noch immer nicht zu 100 % bekannt sind. Mirensky *et al.* (2010) bewiesen in einem Experiment mit Knochenmarkszellen aber, dass Monocyten dabei eine wichtige Rolle spielen. Er säte drei verschiedene Zellarten auf Scaffolds aus: Einmal normale Knochenmarkszellen, einmal Knochenmarkszellen ohne Monocyten und einmal nur Monozyten. Am Schluss zeigte sich ein signifikanter unterschied zwischen den Gewebe ohne Monocyten und den Gewebe nur aus Monozyten. Während der Durchmesser des erstgenannten bei $0,771 \pm 0,121$ mm lag, war der Durchmesser bei dem Monozytengewebe $1,022 \pm 0,155$ mm (MIRENSKY *et al.* 2010).

Hilfsmittel

Wachstumsfaktoren und chemische Reagenzien haben ebenso großen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften. Beispielsweise verbessert Insulin und Aprotinin⁴ sowohl die mechanischen als auch die vasoreaktiven Merkmale des Gefäßes (YAO *et. al.* 2005). Ebenso verbessert Retinoic Säure und Ascorbinsäure die Genexpression von Kollagen und Elastin (OGLE, MOORADIAN. 2002).

Klinische Anwendungen

Versuche wurden bis jetzt v.a. an Tiermodellen getestet. Dennoch gibt es Varianten, welche auch im klinischen Bereich zum Tragen kamen. Zwei davon seien hier heraus gegriffen:

SHINOKA *et al* (2001) wollten das zeitintensive kultivieren der Zellen umgehen. Somit wurden die Zellen am selben Tag der Transplantation genommen und direkt auf ein Polymergerüst ausgesät. Nach 2-4 Stunden der Inkubation erfolgte die Transplantation in den Körper. Bei 95 % der Patienten wurden keine Calciumanlagerungen, Aneurysmen oder andere Komplikationen beobachtet.

L'HEUREUX *et. al.* (1998) verwendeten die Methode des „Sheet-Based-Tissue-Engineering“. Die Muskelfaserzellen werden in einem Kulturfläschchen zu einem „Sheet“ kultiviert und danach aufgerollt. Sind die Muskelfaserzellen fertig gereift, wird die Innenseite der Röhre mit Endothezellen besät. Diese Methode wurde 2005 auch bei Dialysepatienten getestet. Die Zellen wurden *in vivo* „trainiert“ und gezüchtet. Bis zu 5 Monate nach der Implantation wurden keine Komplikationen bei den ersten drei Patienten beobachtet.

Diskussion und Ausblick

Die verschiedenen Methoden des *Tissue Engineerings* haben alle ihre Vor- und Nachteile. Während Methoden wie das Bioreaktor-System eine hohe Seeding-Effizienz und Reproduzierbarkeit aufweisen, sind sie dennoch in der Herstellung der

⁴ Aprotinin: Natürliches Polypeptid des Hausrinds, das in der Humanmedizin zur Reduktion der Blutungsneigung eingesetzt wurde.

Gerätschaften sehr komplex. Einfachere Methoden wie das Magnetische Cell seeding haben zwar auch eine hohe Seeding-Effizienz. Hier müssen die Zellen aber auch sehr lange kultiviert werden. Die verschiedenen erfolgreichen *in vivo*-Versuche haben gezeigt, dass *Tissue Engineering* durchaus Zukunft hat. Allerdings darf bei der Forschung der Fokus nicht nur auf eine einzelne Komponente des *Tissue Engineerings* gelegt werden – sei es die *Scaffolds*, die Zellquellen oder die verschiedenen Methoden - sondern es müssen alle Materialien und Methoden unter dem Anspruch der Optimierung erforscht und weiterentwickelt werden.

Die Frage der Zellquellen ist eine sehr ambivalente, da gerade jene Zellen, die für die Forschung auf diesem Gebiet und somit auch für die Menschheit von unschätzbarem Wert sind, auch in ihrer Verwendung sehr umstritten sind. Mit dem Thema Stammzellen und ihrer Verwendung auf verschiedenen Forschungsgebieten werden sich voraussichtlich noch sehr viele Ethik-Kommissionen beschäftigen müssen. Diese Frage ist unumstritten eine sehr politische und die Gesetzgebung bei diesem Thema ist somit leider Schwankungen unterworfen.

Um diese Probleme zu umgehen wäre ein Scaffold als Gefäßersatz ideal. Dieser müsste aber alle Eigenschaften der Blutgefäße mitbringen, die da wären nicht-thromogen, gute mechanische Belastbarkeit und Vasoreaktivität.

Eine nicht zu vernachlässigende Komponente ist die Immunreaktion des Körpers. Deshalb müssen vorklinische Versuche in einer Immunumgebung stattfinden, die dem Menschen zumindest ähnlich ist. ZENG *et al.* (2006) führte in näherer Vergangenheit einen Versuch durch, bei dem in einen Ziegenfötus menschliche Nabelschnurblutzellen indiziert wurden. Theoretisch dürfte die Ziege auf menschliche Zellen keine Immunreaktion zeigen. Dies wäre eine gute Möglichkeit um menschliche Gewebe *in vivo* zu erforschen, ohne, dass ein Mensch Schaden nimmt. (ZHANG *et al.* 2007)

Eine große Herausforderung liegt aber immer noch im Durchmesser der Blutgefäße. Wie wir gesehen haben ist es durchaus möglich Blutgefäße (mit Eigenschaften nativer Blutgefäße) künstlich zu züchten. Dabei kann die Versorgung der Blutgefäße ausschließlich über Diffusion erfolgen. Diffusion ist aber nur bis zu einer Gefäßdicke von 500 μm möglich. Größere Blutgefäße des Körpers werden von eigenen Blutgefäßen versorgt, genannt *Vasa vasorum*. Sollte es gelingen derartige Gefäße zu

züchten und gleichzeitig ihre Versorgung zu gewährleisten, wäre dies ein phänomenaler Durchbruch in der Medizin. Blutgefäße wie die *Vena saphena magna* oder die wichtige *Aorta ascendens* könnten damit ersetzt werden. Allerdings geht dem noch eine sehr lange und intensive Forschungszeit voraus, in welcher jede Methode und jedes verwendete Material in klinischen Studien akribisch geprüft und auf Nebenwirkungen untersucht werden muss.

Quellen

Papers

ZHANG Wen Jie, LIU Wei, CUI Lei, CAO Yilin: Tissue engineering of blood vessel. Foundation for Cellular and Molecular Medicine/ Blackwell Publishing Ltd, 2007.

VILLALONA Gustavo A, M.D., UDELSMAN Brooks B.S., Duncan Daniel R., B.S., McGillicuddy Edward, M.D., Sawh-Martinez Rajendra F., B.S., Hibino Narutoshi, Ph.D., Painter Christopher, B.S., Mirensky Tamar, M.D., Erickson Benjamin, B.S., Shinoka Toshiharu, M.D., Ph.D., and Breuer Christopher K., M.D.: -Seeding Techniques in Vascular Tissue Engineering. Mary Ann Liebert Inc, New Rochelle (USA), 2010.

PANKAJAKSHAN Divya., AGRAWAL Devendra K.: Scaffolds in tissue engineering of blood vessels. Canadian Journal of Physiology & Pharmacology, Kanada, 2010. 88 (9), 855-873.

MIRENSKY Tamar L., HIBINO Narutoshi, SAWH-MARTINEZ Rajendra F., YI Tai, VILLALONA Gustavo, SHINOKA Toshiharu, and BREUER Christopher K.: Tissue-engineered vascular grafts: does cell seeding matter? Journal of Pediatric Surgery. USA, 2010, 45 (6), (1299-1305)

L'HEUREUX N, PAQUET S, LABBE R, GERMAIN L, AUGER FA.: A completely biological tissue-engineered human blood vessel. FASEB J. 1998; 12: 47–56.

L'HEUREUX N, DUSSERRE N, KONIG G, FUENTE L, MARINI A, AVILA H, MANGLANO X, ROBBINS RC, GARRIDO S. American Heart Association's Scientific Sessions 2005 (Dallas, TX). 2005; Abstract 2982.

DANIEL J, ABE K, MCFETRIDGE PS. Development of the human umbilical vein scaffold for cardiovascular tissue engineering applications. ASAIO J. 2005; 51: 252–61.

SHINOKA T, IMAI Y, IKADA Y.: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N England J Med.* 2001; 344: 532–3.

CHO SW, LIM SH, KIM IK, HONG YS, KIM SS, YOO KJ, PARK HY, JANG Y, CHANG BC, CHOI CY, HWANG KC, KIM BS. Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells. *Ann Surg.* 2005; 241: 506–15.

NIKLASON LE, GAO J, ABBOTT WM, HIRSCHI KK, HOUSER S, MARINI R, LANGER R.: Functional arteries grown in vitro. *Science.* 1999; 284: 489–93.

MCKEE JA, BANIK SS, BOYER MJ, HAMAD NM, LAWSON JH, NIKLASON LE, COUNTER CM. Human arteries engineered in vitro. *EMBO Rep.* 2003; 4: 633–8.

TEEBKEN OE, BADER A, STEINHOFF G, HAVERICH A. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000; 19: 381–6.

AMIEL GE, KOMURA M, Shapira O, YOO JJ, YAZDANI S, BERRY J, KAUSHAL S, BISCHOFF J, ATALA A, SOKER S.: Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells. *Tissue Eng.* 2006.

SIMIONESCU DT, LU Q, SONG Y, LEE JS, ROSENBALM TN, KELLEY C, VYAVAHARE NR.: Biocompatibility and remodeling potential of pure arterial elastin and collagen scaffolds. *Biomaterials.* 2006; 27: 702–13.

LI M, MONDRINOS MJ, CHEN X, GANDHI MR, KO FK, LELKES PI.: Co-electrospun poly(lactide-co-glycolide), gelatin, and elastin blends for tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2006.

STITZEL J, LIU J, LEE SJ, KOMURA M, BERRY J, SOKER S, LIM G, VAN DYKE M, CZERW R, YOO JJ, ATALA A.: Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials.* 2006; 27: 1088–94.

YAO L, SWARTZ DD, GUGINO SF, RUSSELL JA, ANDREADIS ST.: Fibrin-based tissue-engineered blood vessels: differential effects of biomaterial and culture parameters on mechanical strength and vascular reactivity. *Tissue Eng.* 2005; 11: 991–1003.

OGLE BM, MOORADIAN DL.: Manipulation of remodeling pathways to enhance the mechanical properties of a tissue engineered blood vessel. *J Biomech Eng.* 2002; 124: 724–33.

ZENG F, CHEN MJ, BALDWIN DA, GONG ZJ, YAN JB, QIAN H, WANG J, JIANG X, REN ZR, SUN D, HUANG SZ.: Multiorgan engraftment and differentiation of human cord blood CD34+ Lin- cells in goats assessed by gene expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 7801–6.

Websites (alle abgerufen am 16. 07.2011)

www.anatomie-online.com

www.onmeda.de

Bildquellen:

Abb. 1: ZHANG Wen Jie et al: Tissue engineering of blood vessel. Foundation for Cellular and Molecular Medicine/ Blackwell Publishing Ltd, 2007.

Abb. 2: www.bioscience.org (abgerufen am 18. 07. 2011)

Abb. 3: www.nrc-cnrc.gc.ca (abgerufen am 20.07.2011)