

# Die Physiologie von Endothelzellen im Tissue Engineering

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation  
von M. Sc. Lutz Christian Dreyer,

geboren am 17.05.1985 in Hannover

2015

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Anaclet Ngezahayo

Korreferentin: Prof. Dr.-Ing. Birgit Glasmacher

Tag der Promotion: 29.05.2015

## Zusammenfassung

Die Innenfläche aller Blutgefäße ist komplett mit einer einzelligen Schicht aus Endothelzellen ausgekleidet. Diese sind an der Regulation von Blutdruck, Blutgerinnung und Thrombusformation, Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe, Entzündungsreaktionen sowie Gefäßneubildung beteiligt. Diese Zellen sind ständig unterschiedlich hohen Schubspannungen durch das fließende Blut ausgesetzt, die durch die Zellen perzipiert werden und physiologische Antworten hervorrufen. Das Endothel ist für die physiologische Funktion von Blutgefäßen unerlässlich und soll auch bei der Rekonstruktion verletzter Blutgefäße, dem vaskulären Tissue Engineering, mithilfe von künstlichen Blutgefäßprothesen-Scaffolds wiederhergestellt werden.

Um die Auswirkungen dieser Schubspannungen auf Endothelzellen zu untersuchen, wurde am Institut für Mehrphasenprozesse ein Bioreaktor nach dem Prinzip eines Kegel-Platte-Systems entwickelt, mit dem definierte Schubspannungen auf kultivierte Endothelzellen appliziert werden können. Die Strömungsbedingungen im Reaktor wurden umfassend untersucht und validiert. Endothelzellen im Strömungsfeld änderten ihre Morphologie und richteten sich wie in physiologischen Blutgefäßen mit der Flussrichtung aus. Diese Ausrichtung wurde über eine eigens entwickelte Software beschrieben und quantifiziert. Nach Modifikation des Systems zur Beanspruchung der Endothelzellen auf porösen Membranen wurde der Einfluss einer Fluidströmung auf die Ausbildung von Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke überprüft, die als molekulare Schranke den Transport gelöster Stoffe zwischen Blut und Gehirn kontrolliert. Im klaren Gegensatz zu veröffentlichten Daten anderer Gruppen konnte dieser Einfluss nicht bestätigt werden.

Darüber hinaus wurden resorbierbare Gefäßprothesen-Scaffolds *in vitro* reproduzierbar und standardisiert durch einen rotierten Besiedlungsreaktor endothelialisiert. Die elektrogesponnenen, tubulären Scaffolds wiesen einen dreischichtigen Aufbau: zwei äußere hydrophile Zell-Kontakt-Schichten aus den Polymeren Polycaprolacon (PCL) und Polylactid (PLA) und eine innere, langsamer degradierende Wandschicht aus PCL. Primäre Endothelzellen aus der Ratten-Aorta bildeten ein dichtes Monolayer auf der Fasermatrix, das in Hämokompatibilitätstests den Material-Blut-Kontakt fast vollständig verhinderte. Für diese Untersuchungen wurde ein Chandler-Loop-System verwendet, in dem Proben in einem Schlauchring durch Rotation einer Blutströmung ausgesetzt werden. Es wurde nachgewiesen, dass die Endothelialisierung eine sehr gute Hämokompatibilität und eine stark verringerten Thrombozytenaktivierung im Vergleich zu unbesiedelten Gefäßprothesen-Scaffolds zur Folge hat.

**Schlagnworte:** Kegel-Platte-Bioreaktor, Schubspannungen, Gefäßprothesen-Scaffolds

## Abstract

The inner surface of all blood vessels is completely lined with a single layer of endothelial cells. These cells are involved in the regulation of blood pressure, coagulation, thrombus formation, solute exchange between blood and tissue, inflammation and vessel formation. Endothelial cells are constantly exposed to blood-borne shear stress of various magnitudes that are perceived by the cells and give rise to physiological responses. The endothelium is essential for physiological function of blood vessels and needs to be recreated during vascular tissue engineering, the reconstruction of injured vessels through artificial vascular graft scaffolds.

At the Institute for Multiphase Processes, a cone-and-plate bioreactor for the application of well-defined shear stress on endothelial cells was developed. Flow conditions in the bioreactor were thoroughly analyzed and validated. Endothelial cells under flow adapted morphology and as observed in physiological blood vessels aligned to the direction of flow. This alignment was analyzed and quantified using a specifically built software. Further modifications of the bioreactor allowed the treatment of endothelial cells cultivated on porous membranes. The influence of fluid flow on blood brain barrier properties of cerebral endothelial cells was evaluated. This molecular barrier controls the transport of solutes between blood and brain and prevents paracellular diffusion. In disagreement to published data by other groups, an influence of shear stress on barrier properties could not be reproduced.

Furthermore, resorbable vascular grafts were endothelialized *in vitro* in a reproducible and standardized way using a rotatory seeding reactor. Tubular grafts were produced by electrospinning and consisted of three layers. Both outer wall layers were composed of a polycaprolactone (PCL) and polylactic acid (PLA) blend as hydrophilic cell contact layers, while the inner layer consisted of pure PCL for graft stability and a slower degradation rate. Primary rat aorta endothelial cells formed a consistent monolayer on top of the fiber matrix and prevented blood-material contact in subsequent hemocompatibility testing. A Chandler-loop system for the exposition of samples to a blood flow in a rotating tube loop was used. Graft endothelialization led to a very good hemocompatibility with a distinctly decreased platelet activation compared to non-seeded graft scaffolds.

**Keywords:** cone-and-plate bioreactor, shear stress, vascular graft scaffolds



## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Das vaskuläre System.....	1
1.2 Physiologie der Endothelzellen.....	6
1.2.1 Endothel.....	6
1.2.2 Schubspannungen in Blutgefäßen.....	7
1.2.3 Blut-Hirn-Schranke.....	9
1.2.4 Experimentelle Applikation von Schubspannungen.....	11
1.3 Vaskuläres Tissue Engineering.....	14
1.3.1 Klinischer Gefäßersatz.....	14
1.3.2 Tissue Engineering.....	15
1.3.3 Scaffold-Biomaterialien.....	16
1.3.4 Elektrospinnen.....	17
1.3.5 Zelluläre Besiedlung von Gefäßprothesen.....	19
1.4 Veröffentlichungen.....	21
2 Ergebnisse.....	22
2.1 Ein weiterentwickelter Kegel-Platte-Reaktor für die <i>In-vitro</i> -Applikation von Schubspannungen auf adhärente Zellen.....	22
2.2 Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke ändern durch Schubspannungen ihre Morphologie, aber nicht die Barriere-Eigenschaften.....	24
2.3 Eine Vorbesiedlung mit Endothelzellen verbessert die Hämokompatibilität elektrogessponnener Gefäßprothesen.....	26
3 Diskussion.....	30
3.1 Zur Physiologie von Endothelzellen im Tissue Engineering.....	30
3.2 Applikation von Schubspannungen auf Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke.....	31
3.3 Vaskuläres Tissue Engineering.....	33
3.4 Ausblick.....	37
Literatur.....	39

Anhang.....	50
Lebenslauf.....	50
Publikationsliste.....	51
An advanced cone-and-plate reactor.....	52
Fluid shear stress changes morphology.....	59
Hemocompatibility of electrospun vascular grafts.....	81
Danksagung.....	103

---

## **1 Einleitung**

---

### **1.1 Das vaskuläre System**

Die Funktionalität des gesamten Körpers wird durch ein komplexes Blutgefäßsystem gewährleistet. Die Versorgung der unterschiedlichen Gewebe mit Nährstoffen, der Transport von Stoffwechselprodukten, Atemgasen und Wärme sowie die Unterstützung des Immunsystems zählen zu den wichtigsten Aufgaben des Blutkreislaufs. Das Blut wird durch den rechten Herzventrikel in den Lungenkreislauf befördert, in dem Kohlenstoffdioxid abgegeben wird und das Blut mit Sauerstoff angereichert wird. Anschließend wird das Blut durch den linken Ventrikel über die Aorta in das Hochdrucksystem des Körperkreislaufs gepumpt. Das Blutgefäßsystem verzweigt sich in Arterien und Arteriolen abnehmenden Durchmessers und gewährleistet die Versorgung der Organe (Markl und Sadava, 2011). In Abhängigkeit der Gefäßdurchmesser und des Gefäßwiderstands sinken dabei die Strömungsgeschwindigkeit und der Druck des Blutes. Über eine sehr starke Verästelung der Blutkapillaren werden die unterschiedlichen Gewebe des Körpers durchblutet. Durch die feinen Blutgefäße werden sehr große Austauschflächen und äußerst kurze Diffusionswege für gelöste Substanzen ermöglicht. Nach der Passage der Gewebe vereinigen sich die Kapillaren und speisen Venolen und großlumigere Venen, die schließlich in die Hohlvene aufgehen, die im Herz endet. Hier herrscht ein sehr niedriger Blutdruck, aber, bedingt durch die geringere Gesamtquerschnittsfläche als im Kapillarsystem, eine wiederum erhöhte Strömungsgeschwindigkeit (Müller et al., 2015).

Die Funktionen, Größenordnungen und mechanischen Belastungen der Blutgefäße unterscheiden sich also erheblich im Gefäßsystem. Der Aufbau ist jedoch – mit Ausnahme der Kapillaren – identisch (Abbildung 1.1), sie alle bestehen aus den drei Wandschichten *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia* (Clauss und Clauss, 2009). Die *Tunica adventitia* ist die äußerste Schicht und stellt das Bindegewebe der Blutgefäße zur Einbettung in das umliegende Gewebe dar. In großlumigen Blutgefäßen enthält sie zudem kleinere Blutgefäße zur Versorgung der Gefäßwand, die *Vasa vasorum*. In kleinen Blutgefäßen dagegen wird das Gewebe der Gefäßwand direkt durch das Gefäß versorgt. Die *Tunica media* besteht vor allem aus glatten Muskelzellen und sorgt für die Stabilität und Kontraktilität der Gefäße. Diese Schicht ist in Gefäßen des arteriellen Hochdrucksystems besonders stark ausgeprägt und für deren Druckbeständigkeit verantwortlich. Die *Tunica intima* ist die innerste Wandschicht und besteht aus einer einzelligen Endothelschicht, die durch die Basalmembran von der *Tunica media* getrennt ist (Müller et al., 2015). Alle Blutgefäße sind vollständig mit Endothelzellen ausgekleidet, wobei die kleinsten Kapillaren ausschließlich durch Endothelzellen gebildet werden.

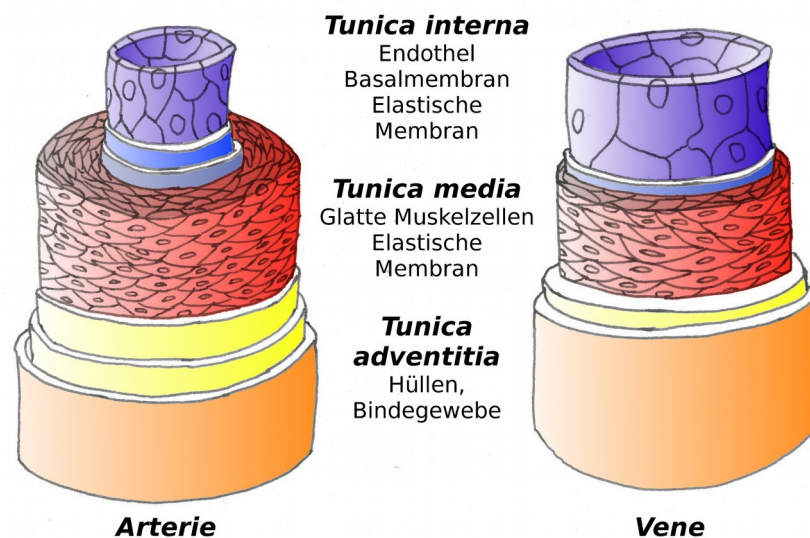


Abbildung 1.1. Aufbau der Gefäßwand von Arterien und Venen. Die elastischen Membranen zwischen den drei Wandschichten sind nur bei einigen Arterien und nicht bei Venen vorhanden. Verändert nach Müller et al., 2015.

Die Durchlässigkeit der Gefäßwand ist in verschiedenen Geweben und Organen stark unterschiedlich. Wasserlösliche Stoffe können die Endothelschicht vor allem über den parazellulären Transportweg passieren: In den meisten Geweben sind die Zell-Zell-Verbindungen (Tight Junctions) der Kapillaren mit Lücken bis 20 nm Durchmesser versehen, die den Durchgang von Wasser und Proteinen bis zu einer bestimmten Größe erlauben (Tarbell, 2010). So kommt es zu einem stetigen Volumenstrom von Blutplasma aus den

Kapillaren heraus, der für einen optimalen diffusiven Stoffaustausch im Gewebe sorgt. Das Plasma durchmischt sich mit der Gewebsflüssigkeit und wird durch die Lymphgefäße wieder abgeführt. Die Lymphe passiert zahlreiche Lymphknoten, die vor allem der Immunabwehr dienen, bevor sie den Venen des Blutgefäßsystems wieder zugeführt wird (Campbell et al., 2009). In Nierenglomeruli oder in der Leber ist das Endothel der Kapillaren dagegen fenestriert, es sind größere Unterbrechungen in den Zell-Zell-Verbindungen der Endothelzellen vorhanden. Dadurch können größere Proteine und Lipoproteine beispielsweise in der Leber aufgenommen werden (Speckmann, 2008).

In anderen Geweben ist die Gefäßwand dagegen sehr wenig durchlässig und stellt eine dichte Barriere dar: In Geweben wie die der Nierentubuli, Darmschleimhaut, Lunge oder im Gehirn ist es für die physiologische Funktion wichtig, dass keine parazelluläre Diffusion zwischen Blut- und Gewebeseite stattfindet (Abbott et al., 2006). Diese Barrierewirkung wird vor allem durch die Verbindungen zwischen den Endothelzellen mittels Tight Junctions gewährleistet und ist als Teil der Immunabwehr und für die jeweiligen spezifischen Gewebefunktionen essentiell (Matter und Balda, 2003). Die dichteste dieser Barrieren stellt dabei das Endothel des Gehirns dar, das die Blut-Hirn-Schranke bildet (Haseloff et al., 2014).

Das Blutgefäßsystem ist in seinem Aufbau nicht statisch, sondern wird kontinuierlich umgebaut. Wird beispielsweise ein Gewebe langfristig mit Sauerstoff unterversorgt, wie bei einer dauerhaft vermehrten Aktivität eines Gewebes, Muskeltraining oder auch bei Tumorwachstum, werden Wachstumsfaktoren wie Angiopoietine ausgeschüttet. Diese fördern eine Angiogenese, ein Aussprossen von Blutgefäßen (Risau, 1997).

Eine wichtige Funktion des Blutgefäßsystems ist die Regulation des Blutdrucks. Durch Kontraktion der glatten Muskelzellen oder Perizyten kann der Gefäßwiderstand und damit die lokale Durchblutung beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass Blutgefäße über die Endothelzellen die Schubspannungen des fließenden Blutes perzipieren und darauf sowohl kurz- als auch langfristig reagieren (Ando und Yamamoto, 2013). Während sich die glatten Muskelzellen der *Tunica media* in Umfangsrichtung der Gefäße, also in Richtung der Dehnung durch den Blutdruck ausrichten (Rayatpisheh et al., 2011), sind Endothelzellen in Gefäßrichtung und mit Strömungsrichtung des Blutes ausgerichtet (Li et al., 2005) (siehe Abbildung 1.2). Eine glatte und gleichmäßige innere Auskleidung der Blutgefäße durch Endothelzellen reduziert zusammen mit der Glykokalyx und assoziierten Proteinen den Strömungswiderstand und vermeidet turbulente Strömungsanteile im Blutfluss (Pries und Kuebler, 2006). Zudem wirken Endothelzellen durch Membranproteine, Glykokalyx und

sezernierte Faktoren antithrombogen und beeinflussen die Gerinnungskaskade des Blutes (Davies, 2009).

Nach Verletzungen von Gefäßen oder Erkrankungen wie Aneurysmen oder Stenosen werden chirurgische Eingriffe nötig. Zu den häufigsten zählen Bypass-Operationen, Gefäß-austausch (Interponate) oder Gefäßrekonstruktionen beispielsweise durch Stents oder Patchplastiken. Die als Alternative zu biologischem Gefäßersatz verwendeten synthetischen Prothesen bestehen häufig aus hydrophoben Polymeren, die eine für diese akzeptable Bio- und Hämokompatibilität bieten. Trotzdem kommt es an den Materialien häufig zu Reaktionen auf der Blut- oder Gewebeseite. Diese Reaktionen führen dazu, dass vor allem kleinlumige, künstliche Gefäßprothesen schlechte Offenheitsraten aufweisen (Aper et al., 2008). Aus diesem Grund gibt es einen Bedarf, synthetische Gefäßprothesen so weiterzuentwickeln, dass die Verträglichkeit erhöht und die Regeneration patienteneigener Gewebe gefördert wird. Für eine solche Geweberegeneration müssen geeignete Gerüststrukturen (Scaffolds) bereitgestellt werden. Die Ausbildung eines durchgängigen Endothels ist

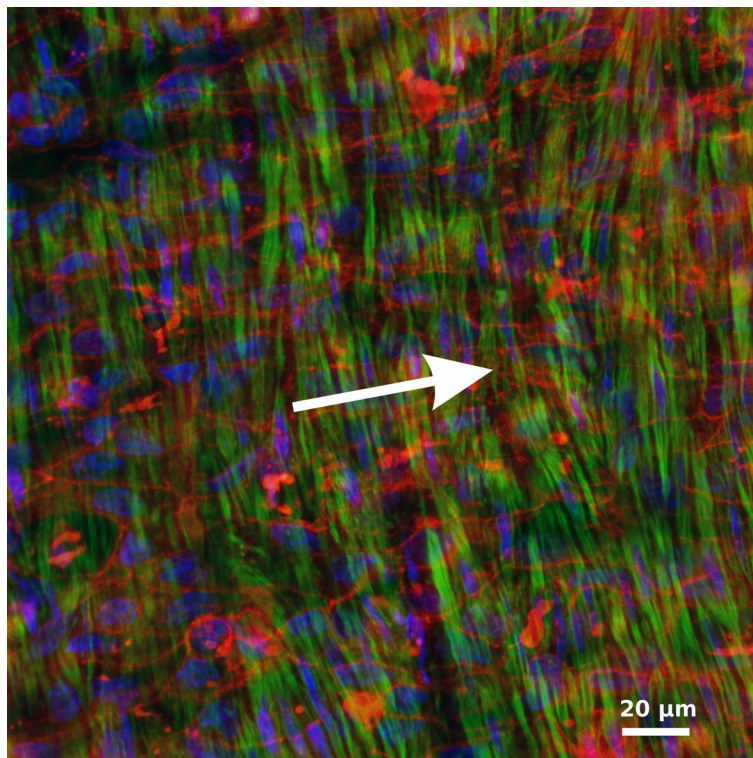


Abbildung 1.2. Endothelzellen und glatte Muskelzellen einer Aorta sind in ihrer Ausrichtung um  $90^\circ$  zueinander versetzt. Endothelzellen richten sich mit dem Blutstrom (Pfeil) aus, glatte Muskelzellen in Umfangsrichtung der Gefäße. Die Abbildung ist die 2D-Projektion einer dreidimensionalen Rasteraufnahme einer Ratten-Aorta nach Phalloidin-Färbung (grün). Die luminalen optischen Schnitte wurden zur Visualisierung rot eingefärbt, Zellkernfärbung durch Hoechst (blau).

hierbei das zentrale Ziel, um eine synthetische Oberfläche hämokompatibel zu gestalten (Seifalian et al., 2002).

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen mechanischer Kräfte, im Speziellen der Schubspannung, auf die Physiologie von Endothelzellen untersucht, wobei ein besonderer Fokus auf die Zellen der Blut-Hirn-Schranke gelegt wurde. Die Untersuchungen wurden mittels eines Kegel-Platte-Bioreaktors durchgeführt, mit dem Schubspannungen im Bereich von 0 bis 26 dyn/cm<sup>2</sup> appliziert wurden. Der Bioreaktor wurde dafür zunächst angepasst und validiert. Die gewonnenen Erkenntnisse über die Physiologie der Endothelzellen wurden genutzt, um die zelluläre Besiedlung von Gefäßprothesen-Scaffolds durch eine Endothelialisierung, die den Material-Blut-Kontakt vermeidet und damit die Thrombogenität der Prothesen reduziert, zu optimieren. Die Hämokompatibilität nach der Besiedlung wurde durch dynamische *In-vitro*-Tests überprüft.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Hypothesen bearbeitet:

I. Die physiologischen Auswirkungen einer Fluidströmung auf Endothelzellen lassen sich in einem Kegel-Platte-System nachbilden und untersuchen.

II. Die Applikation einer Schubspannung verstärkt die epitheliale Barrierewirkung in einem *In-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke.

III. Die Blutverträglichkeit von tissue-engineerten Gefäßprothesen-Scaffolds lässt sich durch eine reproduzierbare und standardisierte Vorbesiedlung mit Endothelzellen erhöhen, was durch dynamische *In-vitro*-Blutversuche mit physiologischen Scherraten nachgewiesen werden kann.

## 1.2 Physiologie der Endothelzellen

### 1.2.1 Endothel

Auch wenn es sich lediglich um eine einzellige Schicht in Blutgefäßen handelt, nimmt das Endothel eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System ein. Es ist an der Regulation von Durchblutung und Blutdruck, Flüssigkeits- und Stoffaustausch mit dem Gewebe, Hämostase und -koagulation, Entzündungsreaktionen und Gefäßneubildung elementar beteiligt (Pries und Kuebler, 2006). Endothelzellen nehmen Einfluss, indem sie endokrine Mediatoren in den Blutstrom freigeben, über Stickstoffmonoxid (NO) und purinerge Signalwege (Bintig et al., 2012) parakrine Reize an die unmittelbare Umgebung weiterleiten, sowie durch transversale Signaltransduktion mit benachbarter glatter Muskulatur über Gap Junctions kommunizieren (Begandt et al., 2013).

Im Gefäßsystem zeigt sich, dass vaskuläre Endothelzellen eine sehr heterogene Zellpopulation sind. So unterscheidet sich das Endothel im venösen und arteriellen System teils deutlich in Morphologie, Art der Mediatorenfreisetzung, Antigenpräsentation sowie der Antwort auf mechanische Reize. Es wurde gezeigt, dass sowohl genetische Grundlagen, also die entwicklungsbiologische Differenzierung der Zellen, als auch die direkte Zellumgebung, der Kontakt zu bestimmten Zellarten sowie spezifische molekulare und mechanische Reize, für die Ausprägung des Phänotyps zuständig sind (Pries und Kuebler, 2006).

Die anti-thrombogene Wirkung der Endothelzellen ist ein wichtiger Bestandteil der Blutgerinnungsregulation. Sie wird unter anderem durch Membranproteine wie Heparansulfate (Wight, 1989), negative Ladungen der Zellmembran (Sarkar et al., 2007) und über die Freisetzung löslicher Faktoren wie Adenosin, Prostacyclin und EDRF (endothelium derived relaxing factor) vermittelt (Speckmann, 2008). Kommen Thrombozyten dagegen mit subendothelialen Zellen oder Proteinen der extrazellulären Matrix in Kontakt, werden sie sofort aktiviert. Nach einem kleineren Gefäßwanddefekt adhärieren Thrombozyten so an exponierte Oberflächen und lösen Reparaturvorgänge aus; bei größeren Verletzungen von Blutgefäßen lösen sie die sekundäre Blutgerinnung mit Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade aus. Zusätzlich wird die Thrombozytenaggregation durch eine Freisetzung von Adenosindiphosphat und -triphosphat (ADP und ATP) durch die verletzten Endothelzellen stimuliert. In intakten Blutgefäßen dagegen werden diese Hämostasen und daraus folgende Thrombenbildungen kontinuierlich durch die Antithrombogenität des Endothels, die Blutströmung und eine ständige Fibrinolyse verhindert (Schmidt und Lang, 2007; Sell et al., 2011).



Viele vasoaktive Moleküle, sowohl endokrine Signale wie Angiotensin, als auch Pharmaka, wirken primär am Endothel der Blutgefäße. Die Endothelzellen setzen daraufhin weitere Faktoren frei, die auf die glatte Muskelschicht wirken. Ein wichtiges Signalmolekül der Endothelzellen ist NO, das als kurzlebiges Radikal eine auf etwa 200  $\mu\text{m}$  räumlich begrenzte Diffusionsweite und somit parakrine Wirkung auf die unmittelbare Umgebung hat (Wood und Garthwaite, 1994). Die Abspaltung von NO aus L-Arginin wird über eine rezeptorvermittelte Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ausgelöst. Das Radikal führt über die Aktivierung einer löslichen Guanylylcyclase in der glatten Muskulatur zu einer Absenkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und damit zu einer Relaxation und einer Vasodilatation (Lang und Lang, 2007).

Endothelzellen sind für die Regulation von inflammatorischen Vorgängen wichtig und reagieren mit der Ausschüttung von Prostaglandinen und Immunmediatoren. Durch die Freisetzung endothelialer Faktoren werden Immunzellen chemotaktisch angezogen, Blutgefäße erweitert und die Diapedese von Immunzellen erleichtert (Speckmann, 2008).

### 1.2.2 Schubspannungen in Blutgefäßen

Im Blutkreislauf wirken maßgeblich drei Arten von mechanischen Belastungen auf die Gefäßwände: Der hydrostatische Druck des Blutes an sich, die durch den Druckunterschied zwischen Blut- und Gewebeseite verursachte tangentielle Wandspannung, sowie die durch den Blutfluss verursachten, zur Gefäßwand parallelen Wandscherkräfte (Speckmann, 2008). Die Größe der resultierenden Kräfte variiert im Gefäßsystem stark mit Blutdruck, Strömungsgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser. Während die Wandspannung hauptsächlich von den glatten Muskelzellen der *Tunica media* getragen wird, sind die Endothelzellen als oberste Schicht vor allem der Schubspannung und dem hydrostatischen Druck ausgesetzt (Papadaki und Eskin, 1997). Diese mechanischen Kräfte lösen in Endothelzellen eine Vielzahl an humoralen, metabolischen und strukturellen Antworten aus (Barakat und Davies, 1998).

In Blutgefäßen herrscht grundsätzlich eine laminare Rohrströmung, die näherungsweise durch das Gesetz von Hagen-Poiseuille beschrieben werden kann (Speckmann, 2008):

$$\dot{V} = \frac{dV}{dt} = \frac{\pi r^4}{8\eta} \frac{\Delta p}{l} \quad (1)$$

mit dem Volumenstrom  $\dot{V}$ , Radius  $r$ , Viskosität  $\eta$ , Druckdifferenz  $\Delta p$  und Länge  $l$ . Die Durchblutung hängt also maßgeblich mit den Gefäßquerschnitten und dem Druckgradienten zusammen, welche vor allem durch eine Dilatation der Arteriolen und durch die

Pumpleistung des Herzens beeinflusst werden. Der Radius hat einen entscheidenden Einfluss, sodass eine Radiuszunahme um 20 % bereits zu einer Verdopplung des Volumensstroms führt.

Das Gesetz von Hagen-Poiseuille gilt dabei mit bestimmten Einschränkungen. Im arteriellen System bildet sich durch den Pulszyklus kein vollständig parabolisches Strömungsprofil aus, wodurch der Gefäßwiderstand vergrößert ist. Das Gefäßsystem weicht durch die elastische Gefäßwand und die Verzweigungen von der idealen Rohrform ab (Speckmann, 2008). Zudem gilt das Gesetz für newtonsche Fluide, bei Blut handelt es aber um ein Casson-Fluid (Sriyab, 2014). In kleinen Gefäßdurchmessern sinkt die scheinbare Blutviskosität durch den Fåhræus-Lindqvist-Effekt, durch den sich die Erythrozyten vermehrt in die Gefäßmitte bewegen (Schmidt und Lang, 2007).

Die Wandschubspannung  $\tau$  ist als Kraft pro Fläche definiert, mit einer parallel zur Fläche wirkenden Kraft, und berechnet sich in Rohrströmungen mit parabolischem Strömungsprofil über (Papaioannou und Stefanadis, 2005):

$$\tau = 4 \eta \frac{v}{r} \quad (2)$$

mit der durchschnittlichen Flussgeschwindigkeit  $v$ . Die Schubspannung wird in der Physiologie üblicherweise in der Nicht-SI-Einheit  $\text{dyn/cm}^2$  angegeben, mit  $1 \text{ dyn/cm}^2 = 0,1 \text{ Pa}$ . Die physiologischen Schubspannungen in verschiedenen Bereichen des Gefäßsystems werden mit  $10\text{-}70 \text{ dyn/cm}^2$  in Arterien,  $1\text{-}6 \text{ dyn/cm}^2$  in Venen (Papaioannou und Stefanadis, 2005) und  $0,01$  bis  $10 \text{ dyn/cm}^2$  in Kapillaren des Gehirns (Luissint et al., 2012) angegeben.

Endothelzellen weisen bedingt durch diese Schubspannungen eine Elongation und Ausrichtung in Richtung der Strömung auf, sodass die Elongation in terminalen Arteriolen deutlich stärker als in Venen ist (Pries und Kuebler, 2006). Ye et al. formulierten die Hypothese, dass die Endothelzellen der Kapillaren im Gehirn dagegen anders auf eine Scherung reagieren und keine Ausrichtung und Elongation zeigen, mit der Folge, dass kleinere Zell-Zell-Kontaktflächen gebildet werden (Ye et al., 2014).

Eine längerfristige Steigerung der vaskulären Schubspannungen löst eine zelluläre Proliferation, Dickenwachstum der Gefäßwand und Erweiterung des Gefäßdurchmessers aus (Papaioannou und Stefanadis, 2005). Kurzfristige Erhöhungen haben *in vivo* Vasodilatationen durch eine Calcium-abhängige Freisetzung von NO durch die Endothelzellen zur Folge (Ando und Yamamoto, 2009). Dabei lösen vergleichbare Schubspannungen in Venen eine geringere Antwort der Endothelzellen aus. Durch erhöhte Schubspannungen wird in

Endothelzellen zudem die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren und Cytokine ausgelöst und die Expression von etwa 3 % der aktiven Gene beeinflusst (Ando und Yamamoto, 2009).

Die Bedeutung des Blutflusses wird auch bei der Betrachtung zahlreicher Erkrankungen deutlich: Arteriosklerose entsteht gerade an Stellen, an denen die Blutströmung gestört ist, beispielsweise nach einer Schädigung der Gefäßwand oder des Endothels (Shi und Tarbell, 2011).

Der Mechanismus der Mechanotransduktion von Schubspannungen durch Endothelzellen ist noch nicht vollständig verstanden. Es kommen zahlreiche Signaltransduktionswege in Frage, es werden unter anderem Ionenkanäle, Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, Caveolae, Zell-Zell-Kontakte, das Cytoskelett, die Glycocalyx oder primäre Cilien als primäre Rezeptoren einer zellulären Scherung diskutiert (Ando und Yamamoto, 2009).

### **1.2.3 Blut-Hirn-Schranke**

Im menschlichen Organismus ist das Gehirn nach der Leber das Organ mit der höchsten Stoffwechselrate. 15-20 % des Grundumsatzes des Körpers wird durch das Gehirn verursacht (Wong et al., 2013), bei Beanspruchung kann dieser Anteil noch gesteigert werden. Die Funktion der Nervenzellen erfordert nicht nur eine ständig hohe Energieversorgung durch vor allem Glukose und Sauerstoff, sondern ist auch auf eine strikte Regulation des Ionen-, pH- und Wasserhaushaltes angewiesen. Der Energiebedarf ist vor allem in der grauen Substanz sehr hoch – hier befinden sich die Zellkörper der Nervenzellen, während die weiße Substanz vor allem aus Nervenfasern und Myelin besteht. Der erstgenannte Bereich ist aus diesem Grund sehr stark von Kapillaren durchzogen.

Zusätzlich zur Gewährleistung und Aufrechterhaltung eines enormen und stark variablen Stoffaustauschs ist die Aufgabe des Endothels der Schutz dieses komplexen und empfindlichen Systems vor äußeren Einflüssen. Die Blutgefäße des zentralen Nervensystems bilden die Blut-Hirn-Schranke, die die freie Diffusion von im Blut gelösten Substanzen in die Nervengewebe fast vollständig verhindert. So kann beispielsweise die Ionenhomöostase des Gehirns aufrechterhalten werden – die Konzentrationen von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$  sind im Gehirn höher,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ - und Proteinkonzentrationen niedriger als im Blutplasma (Abbott et al., 2006). Paul Ehrlich konnte schon 1885 zeigen, dass in den Blutkreislauf injizierte Farbstoffe die meisten Organe, aber nicht das Rückenmark und Gehirn färben. Er vermutete die Ursache unter anderem in der „die Aufnahme beherrschenden Flächen im Gehirn“ (Ehrlich, 1885).

Die Blut-Hirn-Schranke wird durch den besonderen Phänotyp der cerebralen Endothelzellen gebildet, die eine physikalische, metabolische und Transport-Barriere bilden. Die Endothelzellen sind durch besonders dichte Zell-Zell-Kontakte aus Tight Junctions und Adherens Junctions miteinander verbunden. Die Tight Junctions bestehen hauptsächlich aus Claudinen und Occludin und sind für die physikalische Barrierewirkung der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich (Wong et al., 2013). Außerdem gewährleisten sie eine asymmetrische Verteilung der Membranproteine und sorgen so für die zelluläre Polarität, die einen kontrollierten Transport über das Endothel erst ermöglicht (Cardoso et al., 2010).

Der transzelluläre Weg ist durch die geringe Aktivität an Endocytose, Transcytose und Pinocytose ebenfalls stark eingeschränkt (Pries und Kuebler, 2006; Wilhelm et al., 2011). Das ermöglicht den aktiven, kontrollierten Transport von Nährstoffen und Ionen über die Barriere. Durch diese Mechanismen wird aber nicht nur der Durchgang schädlicher Substanzen verhindert, auch 98% aller Medikamente mit kleinen Molekülmassen passieren die Blut-Hirn-Schranke nicht (Pardridge, 2005). Aus diesem Grund wird die Blut-Hirn-Schranke als das größte Hindernis in der Behandlung neurologischer Erkrankungen betrachtet (Kubota et al., 2006). Damit bestimmte Wirkstoffe wie etwa Chemotherapeutika passieren können, muss in der Klinik die Barrierewirkung der Endothelzellen kurzfristig und reversibel durch Gabe einer hyperosmotischen Mannitol-Lösung gestört werden (Cucullo et al., 2008).

Eine solche Änderung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke ist auch bei zahlreichen Erkrankungen zu beobachten. Sie wurde nach ischämischen Hirninfarkten und Schädel-Hirn-Traumata, bei Diabetikern und in Anwesenheit von Entzündungsmediatoren im Blut nachgewiesen. Außerdem ist eine Herabsetzung der Permeabilität an der Pathogenese von Alzheimer, Multipler Sklerose, Epilepsie, ALS, Parkinson, Hirntumoren, Hirnödemen und vielen weiteren Erkrankungen beteiligt (Hawkins und Davis, 2005; Naik und Cucullo, 2012; Wong et al., 2013). Zudem wird in der Blut-Hirn-Schranke die große Familie der ABC-Transporter exprimiert, die ATP-abhängig potentiell schädliche Moleküle zurück in den Blutstrom transportiert und so den Durchgang in das Gehirn verhindert. Vor allem bei der Behandlung von Epilepsien tritt eine Überexpression dieser Transporter häufig auf und führt zu Arzneimittelresistenzen, wodurch Antiepileptika nicht mehr ins Gehirn gelangen (Cucullo et al., 2007).

Um einerseits an den Mechanismen dieser Erkrankungen zu forschen und andererseits an pharmakologischen Wirkstoffen zu arbeiten, die die Blut-Hirn-Schranke erfolgreich passieren können, sind die Bestrebungen groß, ein funktionelles *In-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke zu schaffen (Wilhelm et al., 2011). Die Ansprüche an ein solches Modell

sind die Expression von interendothelialen Tight Junctions, die die parazelluläre Diffusion stark einschränken, eine asymmetrische Verteilung von relevanten Transportern und die Expression von Efflux-Mechanismen wie den ABC-Transportern (Naik und Cucullo, 2012). Die Integrität der endothelialen Blut-Hirn-Schranke wird unter anderem durch zelluläre Interaktionen der neurovaskulären Einheit, die Zellen und Faktoren des Blutes, den dreidimensionalen Aufbau und die extrazelluläre Matrix aufrechterhalten (Wong et al., 2013). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Belege, dass die Schubspannung durch die Blutströmung die Barrierewirkung der Endothelzellen induziert und aufrechterhält (Cucullo et al., 2011b; Walsh et al., 2011; Booth et al., 2014). Aus diesem Grund wurde für ein valides *In-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke der Einbezug einer Fluidströmung empfohlen (Naik und Cucullo, 2012).

#### **1.2.4 Experimentelle Applikation von Schubspannungen**

Um die Auswirkungen von Schubspannungen auf Endothelzellen *in vitro* zu untersuchen, wurden in der Forschung häufig Durchflusskammern (Flow Chambers) verwendet, in denen eine Druckgradient-getriebene Strömung eine Wandschubspannung auf Zellkulturzellen überträgt (Anisi et al., 2014; Ding et al., 2015). Doch gerade für diese Vorrichtungen wurde gezeigt, dass keine uniformen Wandschubspannungen herrschten (Anderson et al., 2006), und die tatsächlichen Scherraten wichen teilweise stark von den Berechnungen ab (Bakker et al., 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass uneinheitlichen Strömungsbedingungen in einer Flow Chamber in individuellen Experimenten zu inhomogenen und ortsabhängigen physiologischen Reaktionen der Endothelzellen führten (McCann et al., 2005). Weitere Nachteile sind die Trägheit des Systems bei Änderungen der Flussgeschwindigkeit (Blackman et al., 2000) und der notwendige hydrostatische Druck, der zusätzlich auf die Zellen appliziert wird (Schnittler et al., 1993).

Eine Alternative für die Applikation von Schubspannungen *in vitro* stellt ein Bioreaktor nach dem Prinzip des Kegel-Platte-Rheometers dar (Schnittler et al., 1993; Buschmann et al., 2005). In einem solchen Rheometer rotiert ein Kegel mit einem sehr flachen Winkel  $\alpha$  über einer statischen Grundplatte mit der Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  (Abbildung 1.3 a). Im Kegelspalt, der in der Regel wenige Millimeter hoch ist, befindet sich ein Fluid, auf das die Rotationsbewegung des Kegels übertragen wird. Da diese kreisförmige Fluidströmung durch zwei relativ zueinander bewegte Flächen bedingt wird, handelt es sich um eine Couette-Strömung (Einav et al., 1994). Die Fluidschichten an der Grenzfläche zur statischen Grundplatte haben der Haftbedingung folgend eine Geschwindigkeit von Null, während die Fluidschichten an der Kegelmantelfläche die Tangentialgeschwindigkeit des

Kegels aufweisen. Vertikal zwischen diesen Grenzschichten bildet sich ein linearer Geschwindigkeitsgradient aus (Abbildung 1.3 b).

Aus dieser konstanten Schergeschwindigkeit  $\dot{\gamma}$  im Spalt resultiert in Abhängigkeit der dynamischen Viskosität  $\eta$  eine gleichförmige Schubspannung im Fluid. Im Rheometer kann über diesen Aufbau die Viskosität einer Flüssigkeit anhand des entstehenden Drehmoments berechnet werden. Das Kegel-Platte-System eignet sich im Vergleich zum Platte-Platte-Aufbau dabei für geringe Viskositäten sowie für nicht-newtonsche Fluide, deren Viskosität eine Funktion der Scherrate beschreibt.

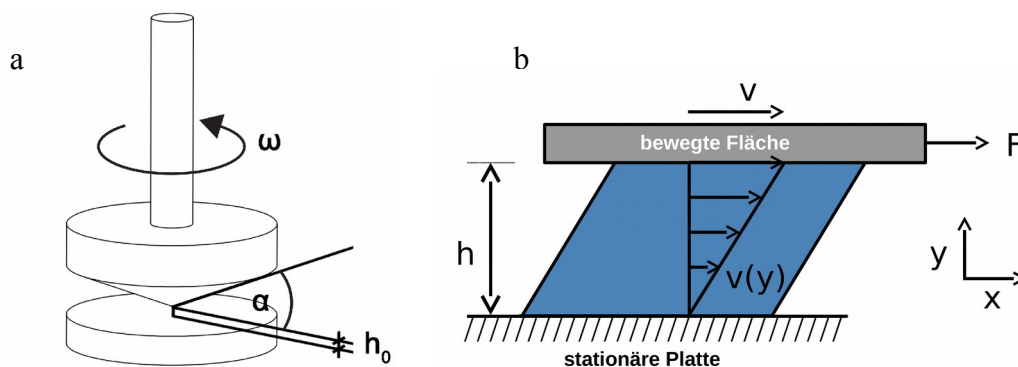


Abbildung 1.3 a. Im Kegel-Platte-System rotiert ein Kegel mit einem flachen Kegelwinkel  $\alpha$  über einer Grundplatte. Die Flüssigkeit im Kegelspalt wird dadurch kreisförmig bewegt. Der Abstand der Kegelspitze zur Grundplatte  $h_0$  sollte gegen Null gehen.

b. Zwischen zwei relativ zueinander bewegten Flächen bildet sich in einem Fluid (blau) eine Couette-Strömung mit einem linearen Geschwindigkeitsverlauf  $v(y)$  über die Höhe  $h$  aus. Aus der Viskosität der Flüssigkeit und der Größe der Fläche resultiert nach Newton die Scherkraft  $F$ .

Bei großen Kegelwinkeln und bei höheren Winkelgeschwindigkeiten beginnen sich laminare Taylor-Wirbel im Kegel-Platte-System zu bilden. Dabei handelt es sich um vertikale Wirbel im Kegelspalt senkrecht zur Strömungsrichtung, die durch Zentrifugalkräfte in den Fluidschichten nahe der Kegelmantelfläche verursacht werden (Buschmann et al., 2005). Dadurch addiert sich zu der kreisförmigen Primärströmung im Kegel-Platte-System eine am Kegel auswärts, an der Bodenplatte einwärts gerichtete Strömungskomponente. Die Wirbel füllen die gesamte Spaltweite aus (Heuser und Krause, 1979), an der Bodenplatte führt dies entsprechend zu einem nach innen gerichteten, spiralförmigen Strömungsbild. Bei sehr hohen Winkelgeschwindigkeiten beginnen sich zusätzliche turbulente Strömungsanteile zu bilden (Azerad und Bansch, 2004). Der Übergang in eine turbulente Strömung kann über eine modifizierte Reynolds-Zahl berechnet werden (Sdougos et al., 1984; Malek et al., 1995).

Für laminare Strömungen und newtonsche Fluide berechnet sich die Schubspannung im Kegel-Platte-System aus der Scherrate und der dynamischen Viskosität:

$$\tau = \eta \dot{\gamma} = \eta \frac{\omega}{\tan \alpha} \quad (3)$$

Im idealen Kegel-Platte-System ist der Abstand zwischen Kegelspitze und Platte gleich Null. In der vorliegenden Ausführung des Systems als Bioreaktor hat die Spitze den definierten Abstand  $h_0$  zum Schalenboden, für die die korrigierte Gleichung der Schubspannung lautet (Jackson & Kaye, 1966; Ponche & Dupuis, 2005):

$$\tau = \eta \frac{\omega r}{h_0 + r \tan \alpha} \quad (4)$$

Ein großer Abstand  $h_0$  senkt die Schubspannung und wirkt sich vor allem bei kleinen Radien, also im Zentrum der Grundplatte, aus. Für eine annähernd gleichförmige Schubspannung in einem Kegel-Platte-Bioreaktor werden möglichst kleine  $h_0$  verwendet, so dass zelluläre Monolayer mit definierten Schubspannungen beaufschlagt werden können.

Im Institut für Mehrphasenprozesse ist ein solcher Bioreaktor entwickelt worden. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Heizeinheit und Thermosensoren im Inkubator erneuert und die LabView-Software zur Steuerung des Bioreaktors neu geschrieben. Die Software regelt die Begasung und Temperatur im Inkubator, sowie die Drehgeschwindigkeiten der Kegel. Die Werte der Sensoren werden während der Experimente über eine Microsoft-Office-Programmierschnittstelle in eine Excel-Datei geschrieben. Zudem wurde das vorhandene Kegel-Platte-System modifiziert, um Schubspannungen in Halterungen für Fasergelege oder Transwell-Inserts zu applizieren.

## 1.3 Vaskuläres Tissue Engineering

### 1.3.1 Klinischer Gefäßersatz

In der Gefäßchirurgie ist es häufig notwendig, erkrankte Blutgefäße durch Bypässe zu überbrücken oder komplett durch Interponate zu ersetzen. Es besteht dabei prinzipiell die Wahl zwischen natürlichen und synthetischen Blutgefäßprothesen. Natürliche Grafts sind Arterien oder Venen, die dem Patienten an anderer Stelle entnommen werden, am häufigsten werden dabei Teile der *Vena saphena magna* verwendet (Sell et al., 2006). Die Verträglichkeit und die Langzeitdurchgängigkeit dieser Prothesen sind sehr hoch, allerdings erfordern sie eine Sekundäroperation und es muss ein passendes und gesundes Blutgefäß im Patienten vorhanden sein. Das stellt ein großes Problem dar, da durch Gefäßkrankungen, Amputationen oder durch vorhergehende Entnahmen bei etwa einem Drittel der Patienten keine geeigneten Gefäße zur Verfügung stehen (Fioretta et al., 2012).

Synthetische Gefäßprothesen dagegen sind in unterschiedlichen Geometrien und Durchmessern herstellbar und können während der Operation auf passende Längen gekürzt werden. Als Materialien werden im klinischen Einsatz hauptsächlich zwei Kunststoffe verwendet: Polyethylenterephthalat (PET) und expandiertes Polytetrafluorethylen (ePTFE). Beide Polymere weisen eine gute Blutverträglichkeit und eine hohe Hydrophobizität auf. Darüber hinaus lassen sich die Polymere mit textilen Verfahren oder durch Extrusion industriell gut verarbeiten und sind durch gängige Methoden sterilisierbar (Santos et al., 2012).

Während großkalibrige, synthetische Gefäßprothesen mit Offenheitsraten von bis zu 97 % nach 5 Jahren (Aper et al., 2008) sehr gute Verträglichkeit zeigen, ist für Gefäßprothesen mit Innendurchmessern kleiner als 6 mm mit geringen Flussgeschwindigkeiten die Wahrscheinlichkeit eines Gefäßverschlusses sehr hoch (Walpoth, 2010). Durchgängigkeiten kleinkalibriger Gefäßprothesen lagen in vergleichenden klinischen Studien nach 5 Jahren bei nur 47 und 54 % (jeweils ePTFE und PET) im Vergleich zu 73 % bei autologen Prothesen (*Vena saphena*) (Teebken et al., 2005). Stenosen dieser Prothesen werden vor allem durch thrombotischen Verschluss verursacht, der durch materialbedingte Thrombozytenaktivierung und -adhäsion an der Prothesenwand verursacht wird (Seifalian et al., 2002). Ein weiteres, häufig auftretendes Problem ist die Verengung des Gefäßlumens durch Bildung und Hyperplasie einer Neointima: Nach der Implantation beginnen glatte Muskelzellen von der Anastomose ausgehend bis 1-2 cm weit in die Prothese einzuwachsen, im Menschen typischerweise mit etwa 0,1 mm pro Woche (Ku und Allen, 1995). Oft tritt nun eine Hyperplasie dieser Neointima auf, die als eine Proliferation und damit Dicken-



wachstum der Muskelschicht definiert ist (de Valence et al., 2012). In Versuchen an Hunden konnte für eine solche intimale Hyperplasie eine inverse Abhängigkeit der Intima-Dicke von der Schubspannung gezeigt werden (Ku und Allen, 1995).

Ein zusätzliches Problem synthetischer Prothesen ist die Anfälligkeit für Infektionen mit Inzidenzen zwischen 1 und 6 % (Taher et al., 2015). Durch die mangelnde Vaskularisierung an der Schnittstelle zwischen Bindegewebe und Prothese können diese Stellen nicht effektiv durch das Immunsystem erreicht werden, sodass sich chronische Infektionsherde oft über Jahre dort festsetzen können. In vielen Fällen muss die Prothese in einer erneuten Operation ausgetauscht werden. Durch die genannten Nachteile von PET- und ePTFE-Prothesen, die beim Ersatz von Gefäßen mit einem Durchmesser kleiner als 6 mm auftreten, bleiben für diese Gefäße natürliche Prothesen (Autografts) der klinische Goldstandard (Aper et al., 2008).

### ***1.3.2 Tissue Engineering***

Das Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Feld der Ingenieurs- und Biowissenschaften und bezeichnet nach Williams „die Gewebeneubildung zur therapeutischen Rekonstruktion des menschlichen Körpers durch bewusste und kontrollierte Stimulation ausgewählter Zielzellen mit einer systematischen Kombination molekularer und mechanischer Signale“ (Williams, 2015). Hierbei werden in der Regel synthetische Gerüststrukturen (Scaffolds) verwendet, die als extrazelluläre Matrix dienen sollen und für die Geweberegeneration optimiert sind. Typischerweise besitzt ein Scaffold eine poröse Grundstruktur und besteht aus einem resorbierbaren Polymer. Die Geometrie ist dem Zielgewebe angepasst und soll zelluläres Wachstum fördern (Ratner, 2004). Das Scaffold wird sukzessive abgebaut und durch körpereigenes Material ersetzt, sodass kein Fremdmaterial dauerhaft im Körper verbleibt.

Um eine echte Alternative für autologe Blutgefäße vor allem beim Ersatz kleinlumiger Gefäße zu finden, wird derzeit an alternativen Materialien geforscht (Chlupác et al., 2009; Wilhelmi et al., 2014). Eine komplette Auskleidung des Gefäßlumens mit Endothelzellen soll den Material-Blut-Kontakt verhindern, das Einwachsen von Blutgefäßen, glatten Muskelzellen und Bindegewebe in das Material von außen die Einbettung in das Gewebe verbessern.

### 1.3.3 Scaffold-Biomaterialien

Als Materialien im vaskulären Tissue Engineering werden in der Forschung drei Materialgruppen verwendet: Biopolymere, nicht-degradierbare und resorbierbare Polymere (Ravi und Chaikof, 2010). Biopolymere sind organischen Ursprungs, oft aufgereinigte Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Elastin und Hyaluronsäure oder sonstigen tierischen und pflanzlichen Ursprungs wie Alginat, Fibrin, Chitosan oder Fibroin (Chung und Park, 2007; Ha et al., 2009).

Ansätze, nicht-degradierbare Kunststoffe wie Polyurethane oder vor allem ePTFE und PET für das vaskuläre Tissue Engineering zu verwenden, werden schon seit den 1980er Jahren verfolgt (Bordenave et al., 2005). Der Fokus lag auf Oberflächenbeschichtungen, chemischen Modifikationen und Proteinmodifikationen und Vorbesiedlungen mit Endothelzellen (Ravi und Chaikof, 2010), um so die Verträglichkeit der konventionellen Gefäßprothesen zu verbessern. Die Modifikationen sollen dazu dienen, dass die Materialien komplett im Patienten endothelialisiert werden und dauerhaft im Körper verbleiben. Dazu muss die sehr hydrophobe und zellabweisende Oberfläche dieser Materialien für eine Zelladhäsion optimiert werden. Hier wurden adhäsive Kollagen- und Fibronectin-Beschichtungen (Sugawara et al., 1997), Säurebehandlungen (Ranjan et al., 2009), Peptidketten (Larsen et al., 2007), Antikörper-Funktionalisierungen (Lu et al., 2013), Titanbeschichtungen (Cikirikcioglu et al., 2006), Heparin- oder Kohlenstoffbeschichtungen und viele weitere Modifikationen (Chlupác et al., 2009) erprobt.

Der Großteil der resorbierbaren Polymere, die im Tissue Engineering eingesetzt werden, gehört zur Gruppe der Polyester aus Carbonsäureester-Monomeren. Die Anforderungen an ein solches Polymer sind eine hohe Biokompatibilität, eine nicht-toxische Degradation innerhalb des gewünschten Zeitraums, gute Verarbeitbarkeit, die Eignung, zelluläres Wachstum zu unterstützen und passende mechanische Eigenschaften (Gunatillake und Adhikari, 2003). Durch die große Auswahl an Polymeren mit unterschiedlichen Eigenschaften können Scaffolds an bestimmte Anforderungen angepasst werden. Über unterschiedliche Kettenlängen, durch Design neuer Copolymere oder durch Polymermischungen (Blends) können mechanische, chemisch-physikalische Eigenschaften und Degradationsraten beeinflusst werden. Die Degradationsraten zur Verfügung stehender resorbierbarer Polymere liegen zwischen einzelnen Monaten und mehreren Jahren (Middleton und Tipton, 2000). Die Degradation erfolgt über eine hydrolytische Spaltung der Polymerketten, die sowohl spontan als auch durch unterschiedliche Enzyme katalysiert stattfinden kann (Sivalingam et al., 2003). Die Degradationsrate ist abhängig von der Diffusion der Wassermoleküle im Material, bei der enzymatischen Degradation außerdem

von der adsorptiv zugänglichen Oberfläche (Ha et al., 2009). Die Degradationsrate von Materialien wird durch den konvektiven Transport im Bereich des Implantats sowie über die Proteinadsorption beeinflusst (Evertz et al., 2013). Über resorbierbare Materialien können zudem langfristige Freisetzen von Wirkstoffen realisiert werden (Chakradeo, 2012; Szentivanyi et al., 2011a).

Häufig verwendete resorbierbare Polymere sind Polyglykolsäure (PGA), Polylactid (PLA) und deren Copolymere Polylactid-co-Glycolide (PLGA) sowie Polycaprolacton (PCL). Während noch keine resorbierbaren Gefäßprothesen zugelassen sind, werden diese Materialien bereits für viele Anwendungen eingesetzt, beispielsweise als Nahtmaterial, für Platten und Schrauben zur Knochenrekonstruktion (Gunatillake und Adhikari, 2003) oder als subdermale, resorbierbare Implantate zur Hormonfreisetzung (Darney et al., 1989). Hydrophile Polymere wie PGA und PLA ermöglichen eine bessere zelluläre Adhäsion als hydrophobe Materialien (Liu et al., 2007).

Zur Verarbeitung polymerer Werkstoffe als Scaffolds für das Tissue Engineering stehen viele Methoden zur Verfügung, unter anderem gerichtete Erstarrung (Bernemann et al., 2011), Gießen (Peña et al., 2010), 3D-Druck (Gruene et al., 2011), Textilverarbeitung (Wilhelmi et al., 2014) oder das Elektrosponnen (Zernetsch et al., 2013).

#### **1.3.4 Elektrosponnen**

Beim Elektrosponnen wird eine Endlosfaser aus einer Polymerlösung oder -schmelze erzeugt. Es wird ein Vlies gerichteter oder ungerichteter Fasern gebildet, das eine hohe Porosität und Offenporigkeit besitzt. In seiner Struktur ist es vergleichbar mit kollagenreicher extrazellulärer Matrix (Abbildung 1.4), weist aber in der Regel größere Faserdurchmesser auf als diese. Da vielfältige Geometrien aus den Fasergelegen hergestellt und in Abhängigkeit der verwendeten Polymere sehr hohe Stabilitäten erreicht werden können, ist das Elektrosponnen als Herstellungsmethode für das Tissue Engineering weit verbreitet (Szentivanyi et al., 2011b).

Die Faser wird beim Elektrosponnen erzeugt, indem eine elektrische Hochspannung zwischen einer Kanüle und einem Kollektor angelegt wird (Abbildung 1.5). Die Polymerlösung wird sehr langsam durch eine Spritzenpumpe aus der Kanüle gefördert. Das elektrische Feld führt dazu, dass der kontinuierliche Tropfen an der Kanüle positiv geladen wird und einen sogenannten Taylor-Konus ausbildet. Durch die Hochspannung wird die Oberflächenspannung des Tropfens überwunden und ein Polymerfaden gebildet, der in Richtung des geerdeten Kollektors beschleunigt wird. Durch inhomogene Ladungsverteilungen

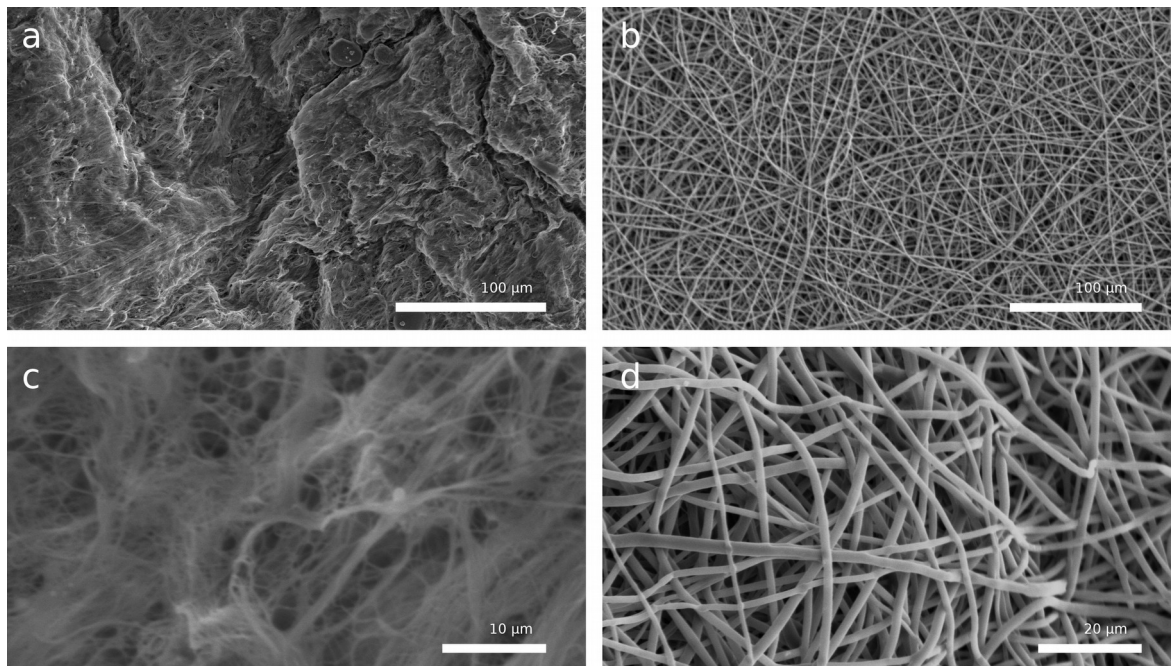


Abbildung 1.4. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer Ratten-Aorta nach Protease-Behandlung (a, c) und eines elektrogewebenen Fasergeleges (b, d). Die extrazelluläre Matrix der Aorta besteht vor allem aus Collagen- und Elastinfasern. Im Vergleich zu den Faserbündeln der extrazellulären Matrix haben die elektrogewebenen Fasern deutlich größere Durchmesser.

wird dieser während der Flugphase ausgelenkt und weiter gestreckt. Das Lösungsmittel verdunstet während der Flugphase und der Faden wird auf dem Kollektor abgelegt (Hasan et al., 2014).

Durch unterschiedliche Prozessparameter, vor allem aber über die Viskosität der Polymerlösung und die elektrische Feldstärke kann die Faserdicke und -morphologie kontrolliert werden (Szentivanyi, 2012). Über die Wahl der Kollektorgeometrie ist eine Vielzahl von dreidimensionalen Scaffolds herstellbar. Um zudem gerichtete Faserstrukturen herzustellen, können über das Gap-Spinning schichtweise orientierte Fasermatten erzeugt werden (Rittinghaus et al., 2013). Wird eine rotierende Welle als Kollektor verwendet, so können röhrenartige Strukturen erzeugt werden, wie etwa als Hüllstruktur für Nervenleitbahnen (Duda et al., 2014) oder für die Verwendung als Gefäßprothesen (Pfeiffer et al., 2014).

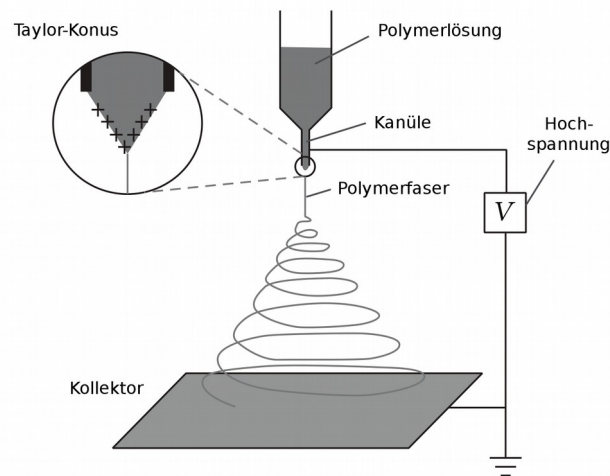


Abbildung 1.5. Beim Elektrospinnen wird aus einer Polymerlösung durch Anlegen einer Hochspannung eine Faser erzeugt, die auf einem geerdeten Kollektor abgelegt wird. Modifiziert nach Duda et al. (2014).

### 1.3.5 Zelluläre Besiedlung von Gefäßprothesen

Für die Besiedlung von tissue-engineerten Gefäßprothesen mit patienteneigenen Zellen gibt es zwei Strategien: Einerseits das spontane, post-operative Einwachsen und Anhaften der Zellen aus dem umliegenden Gewebe und dem Blut und andererseits die Vorbesiedlung in Zellkultur mit Primärzellen, die zuvor dem Patienten entnommen werden müssen (Williams et al., 1991).

Die Implantation unbesiedelter Scaffolds ist einfacher und hat mehrere Vorteile. Sie benötigt keinen langen Vorlauf und kann auch in Notfall-Operationen verwendet werden, ist kostengünstiger, es besteht nicht die Gefahr einer Kontamination während der Kultivierungsphase und es müssen keine Patientenzellen entnommen werden. Allerdings kann die Zeitspanne bis zur vollständigen Besiedlung sehr groß sein: In Tierversuchen dauerte es bis zur vollständigen Endothelialisierung elektrogespinnener Gefäßprothesen mit einer Länge von 10 bzw. 15 mm mehrere Wochen bis Monate (de Valence et al., 2012; Zheng et al., 2012). Zudem gibt es Belege, dass die Endothelialisierung in menschlichen Patienten deutlich langsamer als in vielen Tiermodellen voranschreitet (Ratner, 2004; Sarkar et al., 2007). In diesem Zeitraum bieten die tissue-engineerten Gefäßprothesen-Scaffolds keinen Vorteil gegenüber herkömmlichen synthetischen Prothesen.

Im Falle einer Vorbesiedlung dagegen werden vor der Operation Patientenzellen isoliert und vermehrt und die mit den gewünschten Zellarten besiedelte Prothese implantiert. Hierbei gibt es zwei Strategien, die einstufige und zweistufige Besiedlung. Bei ersterer werden Endothelzellen des Patienten direkt auf das Gefäßprothesen-Scaffold gegeben. Der Vorteil ist die viel schnellere Verfügbarkeit, gerade bei Operationen akuter Gefäßver-

schlüsse. Die zweistufige Besiedlung beinhaltet die Vermehrung der Primärzellen über mehrere Passagen und die darauf folgende Besiedlung der Scaffolds in einem Bioreaktor (Huang und Niklason, 2014). Die Kultivierung benötigt etwa 2-4 Wochen, bevor die Prothese *in vitro* besiedelt werden kann (Seifalian et al., 2002). In Frage kommen primäre Endothelzellen, die auch aus Gefäßen isoliert werden können, die für autologe Transplantationen ungeeignet wären (für eine tabellarische Übersicht siehe Tiwari et al., 2001). Zudem wurde die Isolation von Endothelzellen aus Fett- und Bindegewebe (Pronk et al., 1993), sowie endotheliale Vorläuferzellen (endothelial precursor cells, EPC) (Ranjan et al., 2009) als Zellquelle vorgeschlagen. Vorkommen, Einordnung und Klassifizierung von EPCs werden allerdings gegenwärtig kontrovers diskutiert (Critser et al., 2011; Roura et al., 2013). Auch eine Umprogrammierung von menschlichen Spender-Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC), die die Immunerkennung umgeht, wird diskutiert (Beyer et al., 2004).

Die Endothelialisierung konventioneller synthetischer Gefäßprothesen zeigte bislang nur eingeschränkte Erfolge (Fioretta et al., 2012). In einem Vergleich mehrerer elektrospinnener und herkömmlicher ePTFE-Prothesen zeigte sich, dass ePTFE unabhängig von unterschiedlichen Beschichtungen die geringsten Adhäsionsraten und Viabilitätsraten für primäre Endothelzellen *in vitro* aufwies. Verwendet wurden dabei dreischichtige Prothesen aus PCL, PLA und Polyethylenglycol (PEG) (Pfeiffer et al., 2014).

Am Institut für Mehrphasenprozesse wurde die Herstellung von dreilagigen, elektrospinnenen Gefäßprothesenscaffolds etabliert. Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Polymere und Polymerblends in unterschiedlichen Fasermorphologien in Hinblick auf die zelluläre Besiedlung untersucht. Hierbei wurden Oberflächenbeschichtungen wie Kollagen, Gelatine, Polylysin oder Fibronectin erprobt. Für die beiden äußeren Wandschichten der Gefäßprothesen-Scaffolds, die als Zellkontaktschicht dienen, wurde aufgrund der Vorversuche eine hydrophile PCL/PLA-Mischung mit einer Fibronectin-Beschichtung von  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  gewählt. Für die innere Wandschicht, die vor allem der Stabilität der Scaffolds dienen und eine langsamere Degradationsrate aufweisen sollte, wurde PCL gewählt.

Durch Elektrosponnen hergestellte Gefäßprothesen aus unterschiedlichen resorbierbaren Polymeren wurden schon häufig in Tierversuchen erprobt und zeigten teilweise gute Ergebnisse (etwa Zhao et al., 2013; Pektok et al., 2008), aber auch auftretende Stenosen (Zheng et al., 2012), Thrombusbildung und intimale Hyperplasien (De Visscher et al., 2012). Langzeitversuche mit Beobachtungszeiträumen über 12 Monate sind bislang sehr selten und zeigen, dass Kalzifikationen, intimale Hyperplasien und fehlende Infiltration

glatter Muskelzellen Probleme darstellen können (de Valence et al., 2012; Kuwabara et al., 2012).

Obwohl bislang viele aussichtsreiche Ergebnisse publiziert wurden, sind elektrogessponene Gefäßprothesen noch weit entfernt vom klinischen Einsatz. Nur über die Optimierung der Materialien, die Kenntnis der Endothelzellphysiologie und ein besseres Verständnis der Material-Zell-Interaktionen kann dieses Ziel erreicht werden.

## 1.4 Veröffentlichungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen die Physiologie unterschiedlicher Endothelzelllinien unter dem Einfluss einer Fluidströmung untersucht, zum anderen die Endothelialisierung von tissue-engineerten Gefäßprothesen erprobt. Es sind drei Manuskripte entstanden, die einen Bioreaktor zur *In-vitro*-Applikation von Schubspannungen auf Endothelzellen beschreiben, Untersuchungen zum Einfluss dieser Scherkräfte auf Zellkulturlinien der Blut-Hirn-Schranke zeigen und den Einfluss einer Endothelialisierung auf die Blutverträglichkeit experimenteller Blutgefäßprothesen *in vitro* darstellen.

### **An Advanced Cone-and-Plate Reactor for the *in vitro*-Application of Shear**

**Stress on Adherent Cells.** Veröffentlicht im Journal *Clinical Hemorheology and Microcirculation* (Dreyer et al., 2011)

### **Fluid shear stress changes morphology but does not influence epithelial barrier properties of cerebral endothelial cells.** Manuskript in Bearbeitung.

**Improved hemocompatibility of electrospun vascular grafts by endothelial pre-seeding.** Eingereicht beim *International Journal of Artificial Organs*.

---

## 2 Ergebnisse

---

### 2.1 Ein weiterentwickelter Kegel-Platte-Reaktor für die *In-vitro*-Applikation von Schubspannungen auf adhärente Zellen

Am Institut für Mehrphasenprozesse wurde im Rahmen des Sonderforschungsbeereich/Transregio 37 ein Bioreaktor nach dem Prinzip eines Kegel-Platte-Rheometers entwickelt, der für die Applikation einer Schubspannung auf adhärente Zellen ausgelegt ist. Hierbei wurden 6 parallele Kegel-Platte-Systeme, die durch unabhängig angesteuerte Servomotoren angetrieben werden, in einem Inkubator-Gehäuse untergebracht. Zur Einstellung der Kegelhöhe und zur Bildgebung während der Versuche ist das gesamte System auf einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop montiert. Die Temperierung und Begasung wird über eine eigene Softwarelösung geregelt, die in der grafischen Programmiersprache LabView geschrieben wurde. Ein Vierfach-Gasregler mischt Druckluft, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>, sodass neben der üblichen Inkubation bei 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre auch Versuche unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt werden können. Das System wurde zunächst für die Applikation in sechs „µ-Dish“-Zellkulturschalen des Herstellers Ibidi ausgelegt und später für Sechs-Well-Kulturplatten und Transwell-Zellkultureinsätze erweitert.

Die Strömungsverhältnisse im Reaktor wurden durch Farbfäden untersucht, welche sich an wasserlöslichen, getrockneten Farbstofftropfen auf dem Boden der Zellkulturschalen nach Befüllen des Systems bildeten. Die Farbfäden wurden mit mikroskopischen Serienaufnahmen dokumentiert und vermessen. Es konnte gezeigt werden, dass im System laminare Strömungsbedingungen vorlagen. Wie erwartet, stellten sich für höhere Winkelge-



schwindigkeiten laminare Taylor-Wirbel ein, die durch Zentrifugalkräfte an der Kegeloberfläche bedingt werden (Malek et al., 1995). Diese Sekundärströmung führte am Schalenboden zu einer zweiten, radial gerichteten Geschwindigkeitskomponente, die eine leicht einwärts gerichtete, spiralförmigen Strömungslinie bewirkte (Abbildung 2.1).

Berechnungen mit einer modifizierten Reynolds-Zahl für das Kegel-Platte-System (Sdougos et al., 1984) bestätigen einen laminaren Betrieb mit bis zu  $70 \text{ dyn/cm}^2$ . Die Untersuchungen mit unterschiedlichen Endothelzelllinien im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings mit maximal  $26 \text{ dyn/cm}^2$  durchgeführt, da das System vor allem durch die Adhäsion der Zellen an der Kulturschale limitiert ist.

Somit konnte ein Bioreaktor zur Applikation von definierten Schubspannungen im physiologischen Bereich auf Endothelzellen beschrieben werden, der ein definiertes, großflächig uniformes, wandgetriebenes Strömungsprofil aufweist. Der Reaktor stellt damit eine klare und bessere Alternative für die häufig in der Forschung verwendeten kommerziellen oder individuell hergestellten Durchflussskammern dar, die häufig nicht uniforme (McCann et al., 2005) oder inakkurate und nicht vergleichbare (Anderson et al., 2006) Wandschubspannungen aufweisen.

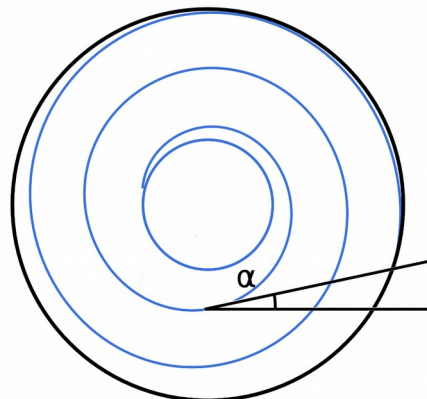


Abbildung 2.1. Durch die laminaren Taylorwirbel addiert sich eine radiale Geschwindigkeitskomponente zu der zirkulären Strömung, sodass die bodennahe Strömung eine einwärts gerichtete Spirale beschreibt. Der Spiralwinkel  $\alpha$  zwischen Kreisbahn und Strömungslinie ist abhängig vom Radius.

## **2.2 Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke ändern durch Schubspannungen ihre Morphologie, aber nicht die Barriere-Eigenschaften**

Für die weitere Quantifizierung der Strömungsgeschwindigkeiten im Kegel-Platte-Bioreaktor wurde ein Partikel-Tracking mit dem Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt (Particle Image Velocimetry, PIV). Der vertikale Geschwindigkeitsverlauf im Kegel-Platte-System an den Radien 3, 5 und 7 mm wurde dabei untersucht. Außer für das Zentrum der Kulturschalen wurde ein linearer Geschwindigkeitsverlauf nachgewiesen, der mit der berechneten Schergeschwindigkeit  $\dot{\gamma}$  übereinstimmte.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Richtung der spiralförmigen Strömung bei der maximal verwendeten Winkelgeschwindigkeit von  $35 \text{ s}^{-1}$ , entsprechend einer Schubspannung von  $26,07 \text{ dyn/cm}^2$ , um maximal  $3,51^\circ$  von der Kreisbahn abwich. Daraus ergab sich eine Erhöhung der Wandschubspannung um 0,2 % im Vergleich zur Berechnung anhand Gleichung 4 (Seite 13), die somit vernachlässigt werden konnte.

Die Auswirkungen der Schubspannung auf die Ausrichtung der Endothelzellen wurden über eine automatisierte Auswertung der Ausrichtung von Aktin-Fasern der Zelle quantifiziert. Für diesen Zweck wurde eine Softwarelösung entwickelt, die auf GNU Octave basierend Schar-Operatoren zur Kantendetektion einsetzt (Schar, 2007). Jedem Pixel der mikroskopischen Aufnahmen wird dabei ein Vektor zugewiesen, der eine gewichtete Richtungsinformation auftretender Kanten enthält. Gibt es im Bereich des Pixels keine Kontraständerung durch eine Kante, so bekommt der Vektor zwar eine Richtung, die resultierende Vektorlänge wird aber sehr kurz. Nach einem Verwerfen aller Vektoren unter einem bestimmten Schwellenwert wird aus den verbleibenden Vektoren jeder Bilddatei ein Histogramm mit einer frei wählbaren Anzahl an Klassen über die Winkel von  $-90^\circ$  bis  $90^\circ$  gebildet. Zusätzlich werden statistische Kennzahlen ausgegeben, um verschiedene Histogramme vergleichen zu können, unter anderem die Kurtosis (Wölbung) und Skewness (Schiefe) der Verteilung, sowie Winkel und Länge des zirkulären Mittelwertvektors.

Durch die Softwarelösung konnte eine große Anzahl von Aufnahmen und Experimenten quantitativ ausgewertet werden. Hierbei zeigte sich eine schubspannungsabhängige Ausprägung der Ausrichtung der Endothelzellen im Bereich von 0 bis  $26 \text{ dyn/cm}^2$ . Die cerebrale Ratten-Endothelzelllinie RBE4 blieb unter den dynamischen Bedingungen als dichtes Monolayer bestehen und zeigte eine elongierte Morphologie.

Nachdem auf diese Weise definierte Schubspannungen auf die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke appliziert werden konnten, wurden die Barriere-Eigenschaften der RBE4 Zellen über den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) und die Farbstoff-Permeabilität ( $P_{app}$ ) überprüft. Die Versuche erfolgten in Transwell-Zellkultureinsätzen, in denen die Endothelzellen auf einer porösen Membran kultiviert werden. In Widerspruch zu Ergebnissen anderer Gruppen (Cucullo et al., 2011b; Santaguida et al., 2006) konnte keine Steigerung der Barriereeigenschaften durch eine Schubspannung festgestellt werden (Abbildung 2.2).

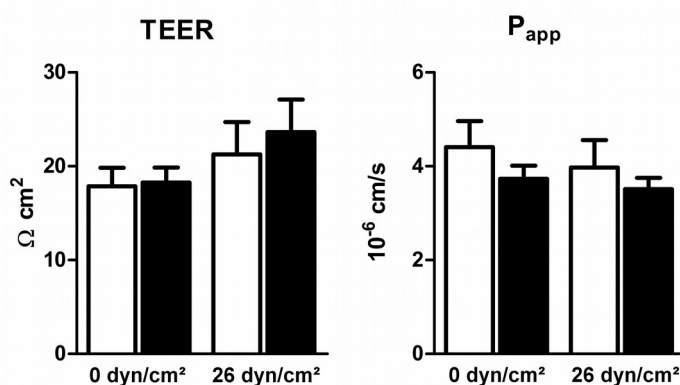


Abbildung 2.2. Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER) und apparente Permeabilität für Natrium-Fluoreszein ( $P_{app}$ ) von RBE4-Zellen vor (weiß) und nach (schwarz) Applikation einer Schubspannung. Durch die Behandlung war keine signifikante Erhöhung des elektrischen Widerstandes oder Verminderung der apparenten Permeabilität festgestellt worden.  $n=14-20$ . Ein statischer Kegel ( $0 \text{ dyn/cm}^2$ ) diente als Kontrolle. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen festgestellt (gepaarter t-Test der Differenzen).

Da die Schubspannungen in den Endothelzellen zu einem aktiven Umbau des Cytosketts, aber nicht wie erwartet zu einer Verstärkung der parazellulären Barriere Wirkung führten, wurde eine Expressionsanalyse verschiedener Tight-Junction-Proteine nach Behandlung mit einer Schubspannung durchgeführt. Die wichtigsten Proteine der Tight Junctions der Blut-Hirn-Schranke sind Occludine (Occl), Claudine (Cldn) und junctionale Adhäsionsmoleküle (JAM) wie Zonula Occludens (ZO) (Luissint et al., 2012). Für keine dieser Proteine wurde eine signifikante Steigerung der RNA-Menge nachgewiesen (Abbildung 2.3). Vergleichende Untersuchungen an humanen hCMEC/D3-Zellen ergaben gleiche Ergebnisse.

Durch Immunfluoreszenz-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Schubspannung auch zu keiner veränderten zellulären Lokalisierung von Cldn-3-Proteinen führte. Somit wurde gezeigt, dass die Applikation von definierten Schubspannungen über 24 Stunden nicht zu einer verstärkten Bildung von Tight Junctions in RBE4 Zellen führte.

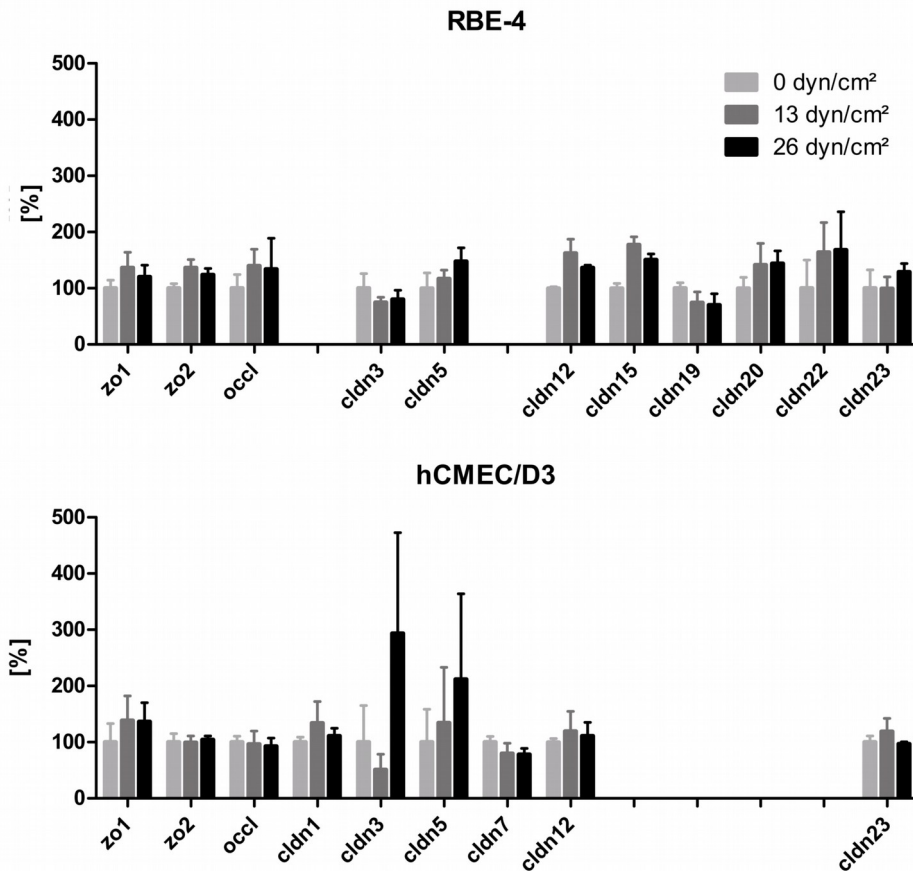


Abbildung 2.3. Schubspannungs-abhängige RNA-Expression von Tight-Junction-Proteinen. Keine der untersuchten Proteine wurde in den Zelllinien RBE-4 und hCMEC/D3 durch Schubspannung signifikant hochreguliert.  $n = 3-6$ , 0, 13, 26 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 Stunden. Cldn1, 7, 15, 19, 20 wurden jeweils nur in einer der beiden Zelllinien exprimiert.

### 2.3 Eine Vorbesiedlung mit Endothelzellen verbessert die Hämokompatibilität elektrogenespinnener Gefäßprothesen

Am Institut für Mehrphasenprozesse wurde eine dreischichtige, hoch-poröse Gefäßprothese aus den Polymeren PCL und PLA entwickelt. Dabei bestanden die äußeren Wand-schichten aus PCL/PLA im Verhältnis 2:1, die innere Schicht aus reinem PCL. Die Gefäßprothesen wurden durch Elektrosponnen hergestellt, eine 4 mm starke Welle diente als Kollektor. Die Wandstärke betrug  $90,6 \mu\text{m} \pm 1,0 \mu\text{m}$  mit einem Faserdurchmesser von  $1,00 \pm 0,007 \mu\text{m}$ . Nachdem in Vorversuchen mit einer diskontinuierlichen Herstellung eine Trennung der Wandschichten sowie ein schichtweises Aufreißen der Prothesen in nachfol-

genden Zugversuchen aufgetreten waren, wurde durch die Verwendung von coaxialen Spinddüsen ein kontinuierlicher Übergang der Schichten erreicht.

Die beiden äußeren Wandschichten aus PCL/PLA weisen eine höhere Hydrophilie als die innere PCL-Schicht auf und degradieren aufgrund des PLA-Anteils schneller. Sie sind für eine optimale zelluläre Adhäsion und auf der Außenfläche der Prothese für ein Einwachsen von Bindegewebszellen, Blutgefäßen und Immunzellen bestimmt, während die mittlere PCL-Schicht bei einer Implantation in den Körper eine höhere und länger andauernde Stabilität bieten soll.

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Sterilisationsmethoden zu untersuchen, wurden mechanische Materialkennwerte vor und nach der Sterilisation verglichen. Dabei wurden – anders als bei Autoklavieren, Ethylenoxid-Behandlung, Plasmasterilisation, die in Vorversuchen getestet worden waren – keine signifikanten Änderungen in Elastizitätsmodul, Zugfestigkeit und Reißdehnung festgestellt.

Die Besiedlung der Gefäßprothesen erfolgte in einem eigens konstruierten Bioreaktor (Abbildung 2.4). Dieser ist auf ein minimales Mediovolumen ausgelegt und besitzt eine Aufnahme für Gefäßprothesen mit einem Innendurchmesser von 4 mm. Als Gehäuse wurde ein 30-ml-Zentrifugenröhrchen verwendet. Die Prothesen werden dabei leicht vorgedehnt und über zwei Titan-Hülsen geschoben. Der Reaktor ermöglicht das Befüllen

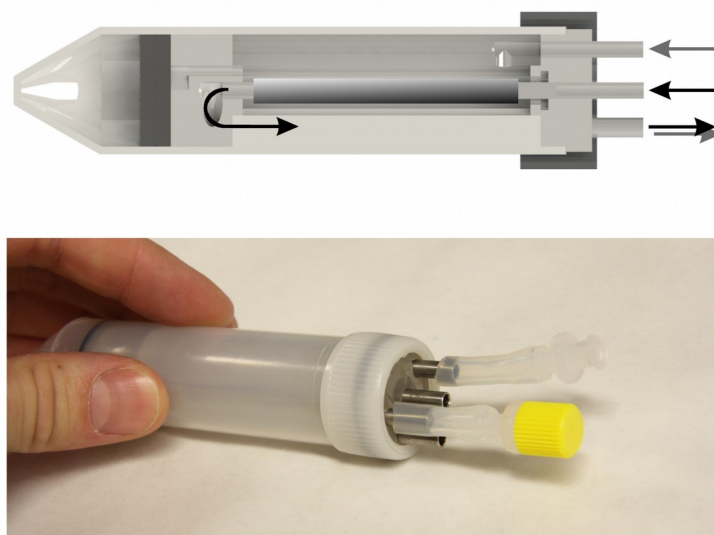


Abbildung 2.4. Die Gefäßprothesen-Scaffolds wurden durch einen kleinformatigen Besiedlungsreaktor reproduzierbar und standardisiert mit Endothelzellen besiedelt. Die Prothese wurde dabei über zwei Titan-Hülsen gespannt. Der Reaktor enthält einen inneren (schwarze) und einen äußeren (graue Pfeile) Medienkreislauf.

der Prothesen durch einen inneren Kreislauf sowie eine Umströmung durch einen äußeren Kreislauf. Zwei Kanäle im Reaktorschiff sorgen für einen Rückfluss der Medien.

Die Gefäßprothesen wurden mit primären Endothelzellen aus adulten Rattenaorten besiedelt. Dafür wurde der äußere Kreislauf mit Zellkulturmedium, der innere Kreislauf mit einer Konzentration von  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml (entsprechend einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> Innenfläche) befüllt. Für eine gleichmäßige Verteilung und Adhärenz der Zellen an der Innenfläche der Prothese wurde eine zu diesem Zweck konstruierte und programmierte Rotationsvorrichtung verwendet, die den Reaktor mit der Prothese axial rotiert. Dabei wurde für eine Stunde alle drei Minuten eine kurze Rotationsbewegung durchgeführt, bei der vier um 90° versetzte Positionen angefahren wurden. In der Ruhephase sedimentierten die suspendierten Zellen und adhärten an der Protheseninnenwand. Das Protokoll war zuvor in Vorversuchen mit Endothelzellen der Zellkulturlinie RBE4 etabliert worden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten eine gleichmäßige Verteilung der Zellen, die innerhalb weniger Tage zu einem Monolayer auswuchsen. Nach der rotatorischen Besiedlung der Prothesen mit primären Endothelzellen erfolgte eine statische Kultivierung für 10 Tage.

Die Rotationsvorrichtung wurde in einem Zellkulturinkubator platziert, die Ansteuerung erfolgte durch eine externe Command-Box. Das Rotationsprotokoll wurde in C++ realisiert und mittels einer Atmega32-Steuerungsplatine (Armel Corporation) ausgeführt. Änderungen des Protokolls konnten über eine Anpassung des Quelltextes durchgeführt und auf das Gerät übertragen werden.

Der Einfluss der Endothelialisierung auf die Hämokompatibilität wurde in einem Chandler-Loop-System untersucht. Im Chandler-Loop wird durch Rotation eines Schlauchrings eine kontinuierliche Blutströmung erzeugt und so die Verwendung von blutschädigenden Pumpen verhindert. In den Schlauchring werden Proben eingebracht, um eine verursachte Blutschädigung, Koagulation oder Thrombozytenaktivierung zu quantifizieren (Chandler, 1958; Jordan et al., 2014). Die Vorteile von *In-vitro*-Hämokompatibilitätstests sind die gute Standardisierbarkeit, Kosteneffizienz, geringe Blutvolumina und hohe Wiederholungszahl.

Die Hämokompatibilitätstests zeigten einen akzeptablen Thrombozytenverlust der unbesiedelten Gefäßprothesen im Vergleich zur Kontrolle. Die Messungen an besiedelten Proben dagegen zeigten einen deutlich geringeren Thrombozytenverlust als in Kontrollversuchen ohne Probenkörper. Durch sezernierte Faktoren der Endothelzellen wie Adenosin, Prostacyclin oder EDRF wurde die Aktivierung der Thrombozyten im gesamten Schlauch-

system gehemmt, sodass der Thrombozytenverlust signifikant geringer als in der Kontrolle blieb.

Die mikroskopischen Untersuchungen nach den Versuchen zeigten ein einschichtiges zelluläres Monolayer auf der Innenfläche der Prothesen (Abbildung 2.5). Die Immunfluoreszenzmarkierung von PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) wurde als Endothelzell-Färbung verwendet. Besonders in den rasterelektronischen Aufnahmen war die für Endothelzellen typische Kopfsteinpflaster-Morphologie zu erkennen.

Grundsätzlich waren auf der Oberfläche aller Proben in ungleichmäßiger Verteilung aktivierte Thrombozyten und Erythrozyten zu erkennen, aber in deutlich höherer Dichte in nicht-besiedelten als in besiedelten Proben.

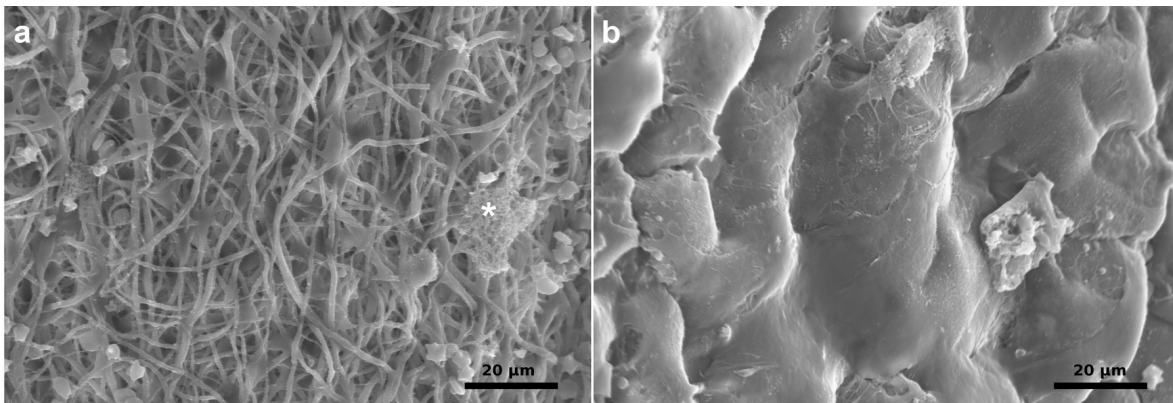


Abbildung 2.5. Innenfläche der unbesiedelten (a) und besiedelten (b) Gefäßprothesen-Scaffolds nach Hämokompatibilitätstests, rasterelektronenmikroskopische Aufnahme. An den Polymerfasern der unbesiedelten Proben haften Erythrozyten, aktivierte Thrombozyten und Fibrinfasern (\*). Die besiedelten Scaffolds waren von einem Endothel-Monolayer bedeckt, an denen nur einzelne Blutzellen anhafteten.

---

### 3 Diskussion

---

#### 3.1 Zur Physiologie von Endothelzellen im Tissue Engineering

Endothelzellen bilden die *Adventitia interna* der Blutgefäße und regulieren als die Schicht, die mit den Bestandteilen des Blutes und dem Fluidstrom in direktem Kontakt steht, wichtige Gefäßfunktionen. Schubspannungen lösen in Endothelzellen kurz- und langfristig viele physiologische Reaktionen aus, die *in vitro* nachgewiesen werden können. Die Einflüsse der Schubspannungen durch das fließende Blut sind wichtig, um einerseits normale physiologische Endothelzellfunktion, andererseits vaskuläre Erkrankungen wie Arteriosklerose, Bluthochdruck oder Thrombose zu verstehen (Ando und Yamamoto, 2009; Farcas et al., 2009). Es gibt Hinweise, dass auch die endotheliale Barrierewirkung der Blut-Hirn-Schranke durch eine Schubspannung verstärkt wird. Im Tissue Engineering ist eine funktionelle Endothelschicht ein wichtiger Bestandteil bei der Wiederherstellung des natürlichen Gefäßaufbaus. Hier sorgen die Endothelzellen für die Antithrombogenität rekonstruierter Gefäße und erhalten die langfristige Durchgängigkeit der Gefäßprothesen-Scaffolds (Ratner, 2007).

In dieser Arbeit wurden Endothelzellen unter dem Einfluss einer Schubspannung untersucht und diese Zellen für das vaskuläre Tissue Engineering *in vitro* eingesetzt. Dafür wurden unterschiedliche zellphysiologische und technische Ansätze verfolgt und neue Methoden etabliert. Im Rahmen der Arbeit sind drei Manuskripte entstanden, die einen Kegel-Platte-Bioreaktor beschreiben und validieren, dynamische Versuche an Endothel-



zellen der Blut-Hirn-Schranke zeigen und dynamische *In-vitro*-Hamokompatibilitätstest von Gefäßprothesen-Scaffolds nach einer zellulären Besiedlung beschreiben.

### **3.2 Applikation von Schubspannungen auf Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke**

In Veröffentlichungen zu den Auswirkungen von Schubspannungen auf Endothelzellen wurden Durchflussskammern (Anisi et al., 2014; Ding et al., 2015), Kapillarsysteme (Neuhaus et al., 2006; Santaguida et al., 2006) oder Mikrofluid-Chips (Booth et al., 2014; Griep et al., 2013) eingesetzt. Diese Systeme benötigen eine Druckdifferenz, verfügen über keine gleichförmige Ausprägung der Schubspannung und weisen zum Teil turbulente Strömungsanteile und nicht untereinander vergleichbare Schubspannungen auf (Anderson und Knothe Tate, 2007; Bakker et al., 2003). Aus diesem Grund verwendeten viele Gruppen Bioreaktoren nach dem Kegel-Platte-Prinzip, um Schubspannungen auf Endothelzellen zu applizieren (Flach et al., 2008; Osborn, 2005; Blackman et al., 2000; Nagel et al., 1994). Die Vorteile bestehen in der genau bekannten und uniformen Schubspannung durch eine Couette-Strömung, der ebenen und im Vergleich großen Besiedlungsfläche sowie der Möglichkeit eines Live-Cell-Imagings durch die transparente Bodenplatte. Die exakte Applikation von Schubspannungen in einem solchen Kegel-Platte-Bioreaktor wurde in dieser Arbeit durch Analysen der Strömungsfelder im System gezeigt.

Die experimentelle Relevanz einer definierten Schubspannung für zellbiologische Untersuchungen wurde durch die Quantifizierung der zellulären Ausrichtung dargelegt. Im Bereich von 0-26 dyn/cm<sup>2</sup> zeigten RBE4-Zellen unterschiedlich starke morphologische Anpassungen in Abhängigkeit der Schubspannung. Diese Ausrichtung wurde durch eine eigens entwickelte Software analysiert, die aus mikroskopischen Aufnahmen Histogramme der Winkelverteilungen und statistische Kennzahlen berechnete. Es ist bekannt, dass durch mechanische Kräfte eine Aktin-Reorganisation ausgelöst wird (Luissint et al., 2012). Die Quantifizierung der zellulären Morphologie und Ausrichtung mit der Strömung anhand des Cytoskeletts wurde bereits durch andere Gruppen beschrieben (Yoshigi et al., 2003; Farcas et al., 2009; Hahn et al., 2011). Die in dieser Arbeit gezeigte Auswertung in Histogrammform erlaubt aber wesentlich feinere Abstufungen, um beispielsweise den Winkel der mittleren Ausrichtung zu bestimmen. Zudem werden statistische Kennzahlen ausgegeben, die die zirkuläre Statistik berücksichtigen und den quantitativen Vergleich zwischen unterschiedlichen Versuchsbedingungen erlaubt.

Durch die gezeigten Ergebnisse kann die in dieser Arbeit formulierte Hypothese bestätigt werden, dass sich die physiologischen Auswirkungen einer Fluidströmung auf Endothelzellen in einem Kegel-Platte-System nachbilden und untersuchen lassen können. Limitiert wurden die Versuche vor allem durch die unterschiedlich starke Adhäsion der verschiedenen Zelllinien am Boden der Zellkulturgefäße. Trotz einer Collagen-Beschichtung der Oberflächen ist anzunehmen, dass die extrazelluläre Matrix *in vivo* die Adhäsion von Endothelzellen bei deutlich höheren Schubspannungen erlaubt. Für das arterielle System werden Schubspannungen von bis zu  $70 \text{ dyn/cm}^2$  angegeben (Papaioannou und Stefanadis, 2005).

Die Schubspannung in physiologischen Gefäßen ist als Stimulus nicht nur wichtig für die Gefäßintegrität und -plastizität, sondern induziert und erhält auch die Differenzierung des endothelialen Phänotyps der Blut-Hirn-Schranke (Walsh et al., 2011). Es gibt viele Hinweise auf eine erhöhte physikalische Barrierewirkung der cerebralen Endothelzellen durch eine Schubspannung, wie ein erhöhter transepithelialer elektrischer Widerstand oder eine verringerte epitheliale Permeabilität (Griep et al., 2013; Santaguida et al., 2006; Cucullo et al., 2007; Neuhaus et al., 2006). Außerdem gibt es Belege für eine Expressionssteigerung von verschiedenen Cadherinen und Claudinen, sowie ZO-1 und Occl auf RNA- und Proteinebene (Walsh et al., 2011; Cucullo et al., 2011b; Ting et al., 2012; Colgan et al., 2007).

Der in dieser Arbeit beschriebene Bioreaktor ist nach Kenntnis des Autors die erste Modifikation eines Kegel-Platte-Systems, die die Applikation von Schubspannungen auf ein zelluläres Monolayer auf einer porösen Membran erlaubt. Nur mittels einer solchen Membran kann eine epitheliale Barrierewirkung *in vitro* durch Farbstoff-Permeabilität und transepithelialen elektrischen Widerstand untersucht werden. Membranen wurden in Form von Kapillaren (Cucullo et al., 2011b), integriert in einen Multifluid-Chip (Griep et al., 2013; Booth et al., 2014) oder in den in der Regel statisch kultivierten Transwell-Inserts verwendet. Teilweise wurden Untersuchungen zum Einfluss von Schubspannungen auf die Zellen der Blut-Hirn-Schranke durch Behandlung der in Transwells kultivierten Zellen mittels Rundschüttlern durchgeführt (Warboys et al., 2010; Walsh et al., 2011), obwohl mit dieser Methode turbulente Strömungen, basolaterale Schubspannungen (Colgan et al., 2007) und undefinierte mechanische Belastungen der Zellen zu erwarten sind.

Um die zweite Hypothese dieser Arbeit, eine Schubspannung verstärkt die epitheliale Barriere-Wirkung in einem *In-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke, zu überprüfen, wurde in dem etablierten Modell für die Blut-Hirn-Schranke, dem Transwell-System (Naik und Cucullo, 2012) Versuche im Kegel-Platte-System durchgeführt. In Untersuchungen an zwei

cerebralen, mikrovaskulären Endothelzelllinien, hCMEC/D3 und RBE4, konnte zwar eine morphologische Antwort auf die Schubspannungen nachgewiesen werden, aber nicht die Verstärkung der Barriere-Eigenschaften. Dieses wurde durch TEER- und  $P_{app}$ -Untersuchungen der physikalischen Barriere sowie durch Nachweis der Tight-Junction-Proteine auf RNA- und Lokalisationsebene überprüft. Die Hypothese konnte nicht bestätigt werden.

In den Versuchen wurden die Endothelzellen für jeweils 24 Stunden einer Schubspannung ausgesetzt. Dieser Zeitraum ist vergleichbar mit den Bedingungen der meisten der oben genannten Autoren, mit Ausnahme der zahlreichen Veröffentlichungen von Cucullo und Janigro, die das Kapillarflusssystem „div-BBB“ (*dynamic in vitro blood-brain barrier*) entwickelten und verwendeten (Cucullo et al., 2011a). Hier wurden die Versuche über zwei bis drei Wochen unter dynamischen Bedingungen durchgeführt. Es konnten im div-BBB-System deutliche Steigerungen der physikalischen Barriere und Expressionsänderungen zahlreicher Gene nachgewiesen werden. Im Kegel-Platte-Bioreaktor sind Versuche von so langer Zeitdauer bislang noch nicht durchgeführt worden. Durch die Konstruktion des Kegel-Platte-Systems sind die Versuche nicht weiter parallelisierbar und die Aufrechterhaltung der Sterilität über einen solchen Zeitraum kann ein Problem bedeuten.

Außerdem gibt es Hinweise, dass eine starke morphologische Anpassung an die Schubspannungen, wie an den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien gezeigt, nicht typisch für Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke ist. Die Gruppe um Searson stellte nach Untersuchungen an der immortalisierten Zelllinie HBMEC die Hypothese auf, dass diese nicht in Richtung des Blutflusses elongieren und so die Länge der Zell-Zell-Kontaktfläche minimiert, die epitheliale Barrierewirkung maximiert wird (Ye et al., 2014; Reinitz et al., 2015). Das würde bedeuten, dass die verwendeten Zelllinien zu sehr vom Phänotyp der cerebralen Endothelzellen dedifferenziert sind.

### 3.3 Vaskuläres Tissue Engineering

In den letzten 30 Jahren konnte für konventionelle, synthetische Gefäßprothesen mit einem Durchmesser kleiner als 6 mm keine Verbesserung der langfristigen Durchgängigkeitsraten erreicht werden (Ravi und Chaikof, 2010). Nachdem sich die Endothelialisierung konventioneller Gefäßprothesen nach Beschichtung und Oberflächenstrukturierung bislang als nicht zielführend erwiesen hat (De Visscher et al., 2012; Avci-Adali et al., 2013), wird vermehrt an Alternativen geforscht. Das Ziel des vaskulären Tissue Engineering ist die Entwicklung eines Scaffolds, das eine Rekonstruktion des nativen Gewebeauf-

baus der Gefäßwand ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden in den letzten Jahrzehnten experimentelle Scaffolds in unterschiedlichen Geometrien, Oberflächentopographien, aus diversen Materialien und mit verschiedenen Produktionsmethoden entwickelt (Ratner, 2007). Walpoth und Möller stellen in einem Übersichtsartikel fest, dass resorbierbare Prothesen der Idealvorstellung entsprechen – während das Implantat abgebaut wird, wird gleichzeitig natürliches Gewebe mit vollständiger Funktion regeneriert (Walpoth und Möller, 2011).

Es wurden schon zahlreiche resorbierbare Gefäßprothesen *in vitro* und *in vivo* erprobt. Das Konzept einer porösen Prothese, die erst nach der Implantation im Patienten durch einwachsende Zellen von der Anastomose aus endothelialisiert wird, wurde dabei sehr oft verfolgt. Diese spontane Endothelialisierung aber würde gerade bei menschlichen Patienten einen sehr langen Zeitraum in Anspruch nehmen (Sarkar et al., 2007). Solange das synthetische Material nicht komplett von Endothelzellen bedeckt ist, stellt es mit seiner sehr großen spezifischen Oberfläche eine große Fremdmaterialfläche dar, die in Blutkontakt kommt. In diesem Zeitraum ist die Gefahr einer Thrombose erhöht und die Prothese stellt keine Verbesserung zu konventionellen Prothesen dar. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Ansatz einer standardisierten Vorbesiedlung verfolgt, bei der die Besiedlung in einem Bioreaktor erfolgt.

Erste Langzeitversuche mit elektrogesponnenen Gefäßprothesen-Scaffolds zeigten, dass durch eine nicht vollständige Rekonstruktion der Gefäßwand Probleme wie Kalzifizierungen oder intimale Hyperplasien auftraten (de Valence et al., 2012). Es besteht bei den vorhandenen experimentellen Gefäßprothesen-Scaffolds somit nach wie vor großes Verbesserungspotential. Hasan und Mitarbeiter empfahlen in einem Review zu elektrogesponnenen Gefäßprothesen die Verwendung dreischichtiger Strukturen, um mechanische Eigenschaften, Biokompatibilität, Bioaktivität und Antithrombogenität vereinen zu können (Hasan et al., 2014). Da bekannt ist, dass hydrophile Polymere für eine Zelladhäsion am besten geeignet sind (Liu et al., 2007), und dass das hydrophile PLA alleine zu schnell für eine Verwendung in einer Gefäßprothese degradiert (Teebken und Haverich, 2002), wurde in dieser Arbeit ein PCL/PLA-Gemisch für die äußeren Zell-Kontakt-Schichten verwendet. Als innere Wandschicht wurde reines PCL verwendet, das langsamer degradiert und länger die Stabilität der Prothesen gewährleistet. Für eine im Institut für Mehrphasenprozesse vergleichbar hergestellte elektrogesponnene PCL-Hülle konnte bereits im Tierversuch gezeigt werden, dass Blutgefäße und Immunzellen einwanderten (Duda et al., 2014).

Die Prothesen-Scaffolds wurden in einem speziell angefertigten Bioreaktor mit Endothelzellen besiedelt. Durch eine Rotation im drei-minütigen Rhythmus und dazwischen liegenden Sedimentationsphasen konnten die suspendierten Zellen gleichmäßig auf der gesamten luminalen Oberfläche der Scaffolds adhären. Die Rotation wurde durch eine automatische Vorrichtung ermöglicht und erfolgte in einem Zellkultur-Inkubator. Das optimale Rotationsprotokoll war zuvor in Vorversuchen etabliert worden. Durch eine solche Standardisierung und Optimierung des Besiedlungsvorgangs war es möglich, den Bedarf an primären Zellen zu reduzieren. Während in diesen Versuchen primäre Endothelzellen aus adulten Ratten-Aorten verwendet wurden, ist im späteren klinischen Einsatz die Verfügbarkeit von Primärzellen, gerade bei älteren Patienten, eingeschränkt. Durch den Einsatz von Bioreaktoren kann eine kontrollierte, sichere und reproduzierbare Besiedlung gewährleistet werden (Pörtner et al., 2005; Soletti et al., 2006).

Es ist bekannt, dass eine vollständige Endothelialisierung von kardiovaskulären Implantaten antithrombogen wirkt. Trotzdem gibt es für elektrogenesponnene Gefäßprothesen nur wenige Veröffentlichungen, in denen dieser Einfluss durch Hämokompatibilitätstests vor und nach der Besiedlung quantifiziert wird. In diesen wurden statische *In-vitro*-Tests durchgeführt, bei denen Vollblut oder plättchenreiches Plasma untersucht wurde, nachdem es für einen definierten Zeitraum auf Materialproben gegeben wurde (Yuan et al., 2004; H. Liu et al., 2011, S. Liu et al., 2013). Für vergleichbare und reproduzierbare Untersuchungen unter physiologischen Schubspannungen ist das Chandler-Loop-System sehr viel besser geeignet (Chandler, 1958; Jordan et al., 2014). Die Ergebnisse in dieser Arbeit sind nach Kenntnis des Autors die ersten Veröffentlichungen dynamischer *In-vitro*-Hämokompatibilitätstests von elektrogenesponnenen Gefäßprothesen.

Diese Versuche im Chandler-Loop-System wurden mit Schweineblut und Rattenendothelzellen durchgeführt. Auch wenn im Chandler-Loop-System Komplement-Aktivierung (Fink et al., 2011) und zelluläre Immunantworten (Hoffmann et al., 2005) nachgewiesen werden können, beeinflussen die von Leukozyten freigesetzten Immunmediatoren die Versuche durch das Fehlen einer systemischen Immunantwort nicht. Schweineblut wird für *In-vitro*-Hämokompatibilitätstests sehr häufig verwendet, da sich porcines Blut *in vitro* ähnlich wie humanes Blut verhält und ähnliche Hämolyseraten und Thrombozytenverluste bei gleichen Scherraten zeigt (Klaus et al., 2002; Paul et al., 2003).

Es wurde gezeigt, dass die hergestellten, unbesiedelten Gefäßprothesen-Scaffolds eine geringe Abnahme des Thrombozytenindex in den Versuchen zur Folge hatten. Der für die Abnahme der Thrombozyten bestimmte Wert war mit 28,9 % (leerer Kontroll-Schlauch: 16,9 %) vergleichbar mit dem durch Fink und Kollegen publizierten Wert kommerzieller

ePTFE-Prothesen von 23,5 %. In diesen Versuchen wurden Proben gleicher Länge und Durchmesser für identische Zeiträume in einem Chandler-Loop-System untersucht (Fink et al., 2011). Weitere untersuchte Werte wie die Koagulationszeit oder die Hämolyserate wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen Gefäßprothesen-Scaffolds und Kontrolle auf. Durch die Besiedlung mit einer konfluenten Schicht aus Endothelzellen konnte die Hämokompatibilität im Vergleich zu unbesiedelten Gefäßprothesen-Scaffolds deutlich verbessert werden. Die Thrombozytenzahl nahm in den Versuchen nur um 1,7 % ab, also signifikant weniger als in den Kontroll-Versuchen. Das bedeutet, dass die durch Endothelzellen sezernierten Faktoren die Thrombozytenaktivierung so stark hemmen konnten, dass sogar der aktivierende Effekt des Schlauchmaterials und der experimentellen Bedingungen kompensiert wurde.

Die Hämokompatibilitätstests sind ein wertvolles Instrument, um verschiedene Materialien in Hinblick auf die Blutverträglichkeit zu vergleichen. Die mögliche antithrombogene Wirkung einer Probe wirkt dabei allerdings immer in Kombination zur ursprünglichen Antikoagulation des untersuchten Citratblutes, sodass eine Reaktion *in vivo* stärker ausfallen kann. Insgesamt konnte aber die dritte Hypothese dieser Arbeit bestätigt werden: Die Blutverträglichkeit der Gefäßprothesen-Scaffolds wurde durch eine reproduzierbare und standardisierte Vorbesiedlung mit Endothelzellen erhöht, was durch dynamische *In-vitro*-Blutversuche mit physiologischen Scherraten nachgewiesen wurde. Die hervorragenden Ergebnisse mit primären Zellen und Blut aus etablierten Tiermodellen zeigten, dass diese Scaffolds vielversprechende tissue-engineerte Gefäßprothesen darstellen.

Diese Arbeit beschreibt Untersuchungen zur Physiologie von Endothelzellen, die unter definierten Schubspannungen und in Scaffolds für das Tissue Engineering kultiviert wurden. Erkenntnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, das Verständnis der Endothelfunktion zu erweitern und zukünftig Gefäßprothesen entwickelt zu können, die im Patienten die Rekonstruktion des nativen Gefäßaufbaus unterstützen. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden zahlreiche Methoden neu etabliert. Die Strömungsvisualisierungen durch die Methoden der Farbfadenexperimente und des Laser Scanning Mikroskop-basierten PIV wurden ermöglicht. Der vorhandene Kegel-Platte-Bioreaktor wurde teilweise erneuert und für die Verwendung von Transwell-Inserts modifiziert. Diese Einsätze für Sechs-Well-Platten erlauben die Kultivierung von Zellkulturzellen auf einer porösen Membran. Für diese Membranen wurde die Messung von transepithelialelem Widerstand und Farbstoffpermeabilität zur Quantifizierung der epithelialen Barriere-Eigenschaften eingeführt. Um die morphologische Antwort der Zellen bei verschiedenen Schubspannungen zu vergleichen und quantifizieren, wurde eine GNU Octave-basierte Software entwickelt. Als Ergänzung zu den Versuchen mit Zelllinien wurde die Isolierung

von primären Endothelzellen aus der Ratte etabliert. Cytotoxizitätstests für die Überprüfung unterschiedlicher Materialien und Herstellungsmethoden wurden eingeführt. Die Besiedlung von unterschiedlichen Zellen auf diesen Scaffolds wurde verglichen, dafür verschiedene Materialien und Oberflächenbeschichtungen ausgewählt. Für die rasterelektronenmikroskopische Bildgebung mussten Dünnschnitttechniken und Fixierungsprotokolle eingeführt werden. Zur Besiedlung der tubulären Scaffolds wurden optimierte, rotatorische Besiedlungsprotokolle entworfen.

### 3.4 Ausblick

Der Kegel-Platte-Bioreaktor stellt eine hervorragende Methode zur definierten Applikation von Schubspannungen auf Endothelzellen dar, mit der zahlreiche Fragestellungen bearbeitet werden können. Zunächst kann die Theorie der Gruppe um Searson, dass cerebrale Endothelzellen sich nicht mit der Blutströmung ausrichten, mit primären und weiteren immortalisierten Zelllinien überprüft werden, vor allem mit den von dieser Gruppe verwendeten HBMEC-Zellen (Ye et al., 2014; Reinitz et al., 2015). Bisherige Ergebnisse dieser Arbeit entsprachen nicht diesen Beobachtungen. Zudem können Langzeit-Versuche im Kegel-Platte-Bioreaktor klären, ob die deutlich induzierten Barriere-Eigenschaften nach dynamischer Kultivierung, die Cucullo und Kollegen in den Kapillaren des div-BBB erreichten (Cucullo et al., 2011b), auch im zweidimensionalen Monolayer reproduziert werden können. Für die Funktion der Blut-Hirn-Schranke scheint neben anderen Faktoren die zylindrische Geometrie in den Kapillaren von Bedeutung zu sein (Wong et al., 2013). Im Kegel-Platte-System können Schubspannungen auf ebene Monolayer appliziert werden, unabhängig von einer Krümmung durch die Kapillaren.

Die zelluläre Adhäsion in den Zellkulturgefäßen, die im Kegel-Platte-Bioreaktor verwendet werden, stellte eine Limitierung in den Untersuchungen dar. Da in dieser Arbeit die Adhäsion und das Wachstum von Endothelzellen auf elektrogenesponnenen Fasermatrizes untersucht und optimiert wurde, kann die Verwendung einer solchen Matrix auch als Membran für die dynamische Kultivierung von Zellen im Kegel-Platte-Bioreaktor etabliert werden. Einerseits können so die höheren Schubspannungen des arteriellen Hochdrucksystems untersucht, andererseits weitere Rückschlüsse über den Einfluss der Mikrostruktur und unterschiedlicher Materialien auf das Wachstum der Endothelzellen auf Scaffolds gezogen werden. Analog zur inneren Oberfläche der Gefäßprothesen-Scaffolds können so zweidimensionale Fasermatrizes als Zellkulturmodell dienen.

Der Besiedlungsreaktor für die Gefäßprothesen-Scaffolds ermöglicht durch die beiden Medienkreisläufe gleichzeitig zur Endothelialisierung der inneren Oberfläche die Besiedlung der äußeren Schicht mit glatten Muskelzellen. Die Gefäßprothesen-Scaffolds können dadurch sowohl für die Verwendung im Tissue Engineering weiterentwickelt werden, als auch als dreidimensionales *In-vitro*-Modell für Blutgefäße dienen. Durch einen Medienkreislauf sind dynamische Kultivierungen unter physiologischen Strömungsbedingungen möglich, die in Kombination mit den Versuchen im Kegel-Platte-Bioreaktor verwendet werden können. Ein solches Modell ermöglicht die Untersuchung von physiologischen Reaktionen der Endothelzellen, Wundheilungsvorgängen und Immunzell-Trafficking. Eine Kalzifizierung als eines der Probleme künstlicher und auch nativer Blutgefäße kann auch *in vitro* induziert und untersucht werden (Krings et al., 2009). Der Aufbau des Besiedlungsreaktors kann zusätzlich für Untersuchungen zu Farbstoff-Permeabilität und transepithelialelektrischen Widerstand des Endothels genutzt werden.

Für eine Weiterentwicklung der Gefäßprothesen-Scaffolds für das Tissue Engineering ist es notwendig, ein Ziel-Blutgefäß in einem Modell-Organismus zu definieren. Scaffolds mit geeigneten Innendurchmesser, Wandstärke und Länge müssen produziert und vor eventuellen Tierversuchen mit entsprechenden primären Zellen und Blut *in vitro* auf die Blutverträglichkeit getestet werden.

Für den Einsatz resorbierbarer Gefäßprothesen-Scaffolds ist es wichtig, eine physiologisch sinnvolle Degradationsgeschwindigkeit zu finden. Diese ist beim Einsatz *in vivo* von sehr vielen Faktoren abhängig, kann aber über die Scaffold-Struktur und Wahl der Polymischung beeinflusst werden. Bislang gibt es für das Tissue Engineering nur in wenigen Bereichen klinischen Routineeinsatz, wie etwa bei Knorpelersatz (Hunziker et al., 2015) oder Hautäquivalenten (Groeber et al., 2011). Über das Vermögen der vaskulären Regeneration und die Gestaltungsmöglichkeiten, diese durch geeignete Scaffold-Strukturen zu unterstützen, muss noch viel gelernt werden, bis ein klinischer Einsatz von resorbierbaren Gefäßprothesen denkbar ist.



## Literatur

Abbott, N. J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E. Astrocyte–endothelial Interactions at the Blood–brain Barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7* (1), 41–53.

Anderson, E. J.; Knothe Tate, M. L. Open Access to Novel Dual Flow Chamber Technology for in Vitro Cell Mechanotransduction, Toxicity and Pharmacokinetic Studies. *Biomed. Eng. OnLine* **2007**, *6* (1), 46.

Anderson, E. J.; Falls, T. D.; Sorkin, A. M.; Tate, M. L. The Imperative for Controlled Mechanical Stresses in Unraveling Cellular Mechanisms of Mechanotransduction. *Biomed. Eng. Online* **2006**, *5* (1), 27.

Ando, J.; Yamamoto, K. Vascular Mechanobiology. *Circ. J.* **2009**, *73* (11), 1983–1992.

Ando, J.; Yamamoto, K. Flow Detection and Calcium Signalling in Vascular Endothelial Cells. *Cardiovasc. Res.* **2013**, *99* (2), 260–268.

Anisi, F.; Salehi-Nik, N.; Amoabediny, G.; Pouran, B.; Haghhighipour, N.; Zandieh-Doulabi, B. Applying Shear Stress to Endothelial Cells in a New Perfusion Chamber: Hydrodynamic Analysis. *J. Artif. Organs* **2014**, *17* (4), 329–336.

Aper, T.; Haverich, A.; Teebken, O. E. Der Traum vom idealen Bypassmaterial in der Gefäßchirurgie. *Gefässchirurgie* **2008**, *13* (2), 87–98.

Avcı-Adalı, M.; Kobba, J.; Neumann, B.; Lescan, M.; Perle, N.; Wilhelm, N.; Wiedmaier, H.; Schlensak, C.; Wendel, H. P. Application of a Rotating Bioreactor Consisting of Low-Cost and Ready-to-Use Medical Disposables for *in Vitro* Evaluation of the Endothelialization Efficiency of Small-Caliber Vascular Prostheses: Rotating Bioreactor for Investigation of Endothelialization. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2013**, *101B* (6), 1061–1068.

Azerad, P.; Bänsch, E. Quasi-Stability of the Primary Flow in a Cone and Plate Viscometer. *J. Math. Fluid Mech.* **2004**, *6* (3).

Bakker, D. P.; van der Plaats, A.; Verkerke, G. J.; Busscher, H. J.; van der Mei, H. C. Comparison of Velocity Profiles for Different Flow Chamber Designs Used in Studies of Microbial Adhesion to Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69* (10), 6280–6287.

Barakat, A. I.; Davies, P. F. Mechanisms of Shear Stress Transmission and Transduction in Endothelial Cells. *Chest* **1998**, *114* (1 Suppl), 58S – 63S.

Begandt, D.; Bader, A.; Gerhard, L.; Lindner, J.; Dreyer, L.; Schlingmann, B.; Ngezahayo, A. Dipyrindamole-Related Enhancement of Gap Junction Coupling in the GM-7373 Aortic Endothelial Cells Correlates with an Increase in the Amount of Connexin 43 mRNA and Protein as Well as Gap Junction Plaques. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2013**, *45* (4), 409–419.

- Bernemann, I.; Mueller, T.; Blasczyk, R.; Glasmacher, B.; Hofmann, N. Colonization of Collagen Scaffolds by Adipocytes Derived from Mesenchymal Stem Cells of the Common Marmoset Monkey. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *411* (2), 317–322.
- Beyer, F.; Doebis, C.; Busch, A.; Ritter, T.; Mhashilkar, A.; Marasco, W. M.; Laube, H.; Volk, H.-D.; Seifert, M. Decline of Surface MHC I by Adenoviral Gene Transfer of Anti-MHC I Intrabodies in Human Endothelial Cells-New Perspectives for the Generation of Universal Donor Cells for Tissue Transplantation. *J. Gene Med.* **2004**, *6* (6), 616–623.
- Bintig, W.; Begandt, D.; Schlingmann, B.; Gerhard, L.; Pangalos, M.; Dreyer, L.; Hohnjec, N.; Couraud, P.-O.; Romero, I. A.; Weksler, B. B.; et al. Purine Receptors and Ca<sup>2+</sup> Signalling in the Human Blood–brain Barrier Endothelial Cell Line hCMEC/D3. *Purinergic Signal.* **2012**, *8* (1), 71–80.
- Blackman, B. R.; Barbee, K. A.; Thibault, L. E. In Vitro Cell Shearing Device to Investigate the Dynamic Response of Cells in a Controlled Hydrodynamic Environment. *Ann. Biomed. Eng.* **2000**, *28* (4), 363–372.
- Booth, R.; Noh, S.; Kim, H. A Multiple-Channel, Multiple-Assay Platform for Characterization of Full-Range Shear Stress Effects on Vascular Endothelial Cells. *Lab. Chip* **2014**, *14* (11), 1880.
- 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), 227–234.
- Buschmann, M. H.; Dieterich, P.; Adams, N. A.; Schnittler, H.-J. Analysis of Flow in a Cone-and-Plate Apparatus with Respect to Spatial and Temporal Effects on Endothelial Cells. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *89* (5), 493–502.
- Campbell, N. A.; Kratochwil, A.; Lazar, T.; Reece, J. B. *Biologie*; Pearson Studium: München, 2009.
- Cardoso, F. L.; Brites, D.; Brito, M. A. Looking at the Blood-Brain Barrier: Molecular Anatomy and Possible Investigation Approaches. *Brain Res. Rev.* **2010**, *64* (2), 328–363.
- Chakradeo, T. Sustained Delivery of Bioactive Molecules from Electrospun Fibres Functionalised Using Different Process Modifications, Rebirth: Hannover, **2012**.
- Chandler, A. B. In Vitro Thrombotic Coagulation of the Blood; a Method for Producing a Thrombus. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **1958**, *7* (2), 110–114.
- Chlupác, J.; Filová, E.; Bacáková, L. Blood Vessel Replacement: 50 Years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* **2009**, *58 Suppl 2*, S119–S139.
- Chung, H. J.; Park, T. G. Surface Engineered and Drug Releasing Pre-Fabricated Scaffolds for Tissue Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (4-5), 249–262.

- Cikirikcioglu, M.; Sedelnikov, N.; Osorio-Da Cruz, S.; Khabiri, E.; Donmez Antal, A.; Tatar, T.; Tille, J.-C.; Hess, O. M.; Kalangos, A.; Walpoth, B. H. Improved Neo-Endothelialization of Small Diameter ePTFE Grafts with Titanium Coating. *Int. J. Artif. Organs* **2006**, *29* (10), 990–999.
- Clauss, W.; Clauss, C. *Humanbiologie kompakt*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Neckar, 2009.
- Colgan, O. C.; Ferguson, G.; Collins, N. T.; Murphy, R. P.; Meade, G.; Cahill, P. A.; Cummins, P. M. Regulation of Bovine Brain Microvascular Endothelial Tight Junction Assembly and Barrier Function by Laminar Shear Stress. *AJP Heart Circ. Physiol.* **2007**, *292* (6), H3190–H3197.
- Critser, P. J.; Voytik-Harbin, S. L.; Yoder, M. C. Isolating and Defining Cells to Engineer Human Blood Vessels: Isolating and Defining Cells. *Cell Prolif.* **2011**, *44*, 15–21.
- Cucullo, L.; Hossain, M.; Rapp, E.; Manders, T.; Marchi, N.; Janigro, D. Development of a Humanized In Vitro Blood-Brain Barrier Model to Screen for Brain Penetration of Antiepileptic Drugs. *Epilepsia* **2007**, *48* (3), 505–516.
- Cucullo, L.; Couraud, P.-O.; Weksler, B.; Romero, I.-A.; Hossain, M.; Rapp, E.; Janigro, D. Immortalized Human Brain Endothelial Cells and Flow-Based Vascular Modeling: A Marriage of Convenience for Rational Neurovascular Studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2008**, *28* (2), 312–328.
- Cucullo, L.; Marchi, N.; Hossain, M.; Janigro, D. A Dynamic in Vitro BBB Model for the Study of Immune Cell Trafficking into the Central Nervous System. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2011a**, *31* (2), 767–777.
- Cucullo, L.; Hossain, M.; Puvenna, V.; Marchi, N.; Janigro, D. The Role of Shear Stress in Blood-Brain Barrier Endothelial Physiology. *BMC Neurosci.* **2011b**, *12* (1), 40.
- Darney, P. D.; Monroe, S. E.; Klaisle, C. M.; Alvarado, A. Clinical Evaluation of the Capronor Contraceptive Implant: Preliminary Report. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1989**, *160* (5 Pt 2), 1292–1295.
- Davies, P. F. Hemodynamic Shear Stress and the Endothelium in Cardiovascular Pathophysiology. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2009**, *6* (1), 16–26.
- Ding, Z.; Liu, S.; Deng, X.; Fan, Y.; Wang, X.; Mehta, J. L. Hemodynamic Shear Stress Modulates Endothelial Cell Autophagy: Role of LOX-1. *Int. J. Cardiol.* **2015**, *184*, 86–95.
- Dreyer, L.; Krolitzki, B.; Autschbach, R.; Vogt, P.; Welte, T.; Ngezahayo, A.; Glasmacher, B. An Advanced Cone-and-Plate Reactor for the in Vitro-Application of Shear Stress on Adherent Cells. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2011**, *49* (1-4), 391–397.

Duda, S.; Dreyer, L.; Behrens, P.; Wienecke, S.; Chakradeo, T.; Glasmacher, B.; Haastert-Talini, K. Outer Electrospun Polycaprolactone Shell Induces Massive Foreign Body Reaction and Impairs Axonal Regeneration through 3D Multichannel Chitosan Nerve Guides. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–16.

Ehrlich, P. Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. Dissertation, Universitäts-Klinik Berlin: Berlin, 1885.

Einav, S.; Dewey, C. F.; Hartenbaum, H. Cone-and-Plate Apparatus: A Compact System for Studying Well-Characterized Turbulent Flow Fields. *Exp. Fluids* **1994**, *16* (3-4), 196–202.

Evertz, F.; Hauser, H.; Müller, P. P.; Kietzmann, M.; Maier, H. J.; Glasmacher, B. Magnesium as a Biomaterial and Its Biological Interactions. *Biomed. Eng. Biomed. Tech.* **2013**, *58* ((Suppl. 1)).

Farcas, M. A.; Rouleau, L.; Fraser, R.; Leask, R. L. The Development of 3-D, in Vitro, Endothelial Culture Models for the Study of Coronary Artery Disease. *Biomed. Eng. OnLine* **2009**, *8* (1), 30.

Fink, H.; Hong, J.; Drotz, K.; Risberg, B.; Sanchez, J.; Sellborn, A. An in Vitro Study of Blood Compatibility of Vascular Grafts Made of Bacterial Cellulose in Comparison with Conventionally-Used Graft Materials. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *97A* (1), 52–58.

Fioretta, E. S.; Fledderus, J. O.; Burakowska-Meise, E. A.; Baaijens, F. P. T.; Verhaar, M. C.; Bouten, C. V. C. Polymer-Based Scaffold Designs For In Situ Vascular Tissue Engineering: Controlling Recruitment and Differentiation Behavior of Endothelial Colony Forming Cells. *Macromol. Biosci.* **2012**, *12* (5), 577–590.

Flach, B.; Morgenstern, A.; Schnittler, H.-J. Segmentierung Und Verfolgung Für Die Migrationsanalyse von Endothelzellen. **2008**.

Griep, L. M.; Wolbers, F.; de Wagenaar, B.; ter Braak, P. M.; Weksler, B. B.; Romero, I. A.; Couraud, P. O.; Vermes, I.; van der Meer, A. D.; van den Berg, A. BBB ON CHIP: Microfluidic Platform to Mechanically and Biochemically Modulate Blood-Brain Barrier Function. *Biomed. Microdevices* **2013**, *15* (1), 145–150.

Groeber, F.; Holeiter, M.; Hampel, M.; Hinderer, S.; Schenke-Layland, K. Skin Tissue Engineering—in Vivo and in Vitro Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (4-5), 352–366.

Gruene, M.; Deiwick, A.; Koch, L.; Schlie, S.; Unger, C.; Hofmann, N.; Bernemann, I.; Glasmacher, B.; Chichkov, B. Laser Printing of Stem Cells for Biofabrication of Scaffold-Free Autologous Grafts. *Tissue Eng. Part C Methods* **2011**, *17* (1), 79–87.

Gunatillake, P. A.; Adhikari, R. Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. *Eur. Cell. Mater.* **2003**, *5*, 1–16; discussion 16.

Hahn, C.; Wang, C.; Orr, A. W.; Coon, B. G.; Schwartz, M. A. JNK2 Promotes Endothelial Cell Alignment under Flow. *PloS One* **2011**, *6* (8), e24338.

Hasan, A.; Memic, A.; Annabi, N.; Hossain, M.; Paul, A.; Dokmeci, M. R.; Deghani, F.; Khademhosseini, A. Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering of Vascular Grafts. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (1), 11–25.

Haseloff, R. F.; Dithmer, S.; Winkler, L.; Wolburg, H.; Blasig, I. E. Transmembrane Proteins of the Tight Junctions at the Blood-Brain Barrier: Structural and Functional Aspects. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**.

Ha, S.-W.; Wintermantel, E.; Maier, G. Biokompatible Polymere. In *Medizintechnik*; Hrsg. Wintermantel, E.; Ha, S.-W. Springer: Berlin, 2009; pp. 219–276.

Hawkins, B. T.; Davis, T. P. The Blood-Brain Barrier/neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57* (2), 173–185.

Heuser, G.; Krause, E. The Flow Field of Newtonian Fluids in Cone and Plate Viscometers with Small Gap Angles. *Rheol. Acta* **1979**, *18* (5), 553–564.

Hoffmann, J.; Simon, P.; Zimmermann, A. K.; Lemancyk, M.; Walter, T.; Beyer, M.; Hoffmeister, H.-M.; Ziemer, G.; Wendel, H. P. Thrombospondin 1 as Possible Key Factor in the Hemocompatibility of Endocoronary Prostheses. *Biomaterials* **2005**, *26* (25), 5240–5250.

Huang, A. H.; Niklason, L. E. Engineering of Arteries in Vitro. *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71* (11), 2103–2118.

Hunziker, E. B.; Lippuner, K.; Keel, M. J. B.; Shintani, N. An Educational Review of Cartilage Repair: Precepts & Practice – Myths & Misconceptions – Progress & Prospects. *Osteoarthritis Cartilage* **2015**, *23* (3), 334–350.

Jackson, R.; Kaye, A. The Measurement of the Normal Stress Differences in a Liquid Undergoing Simple Shear Flow Using a Cone-and-Plate Total Thrust Apparatus Only. *Br. J. Appl. Phys.* **1966**, *17* (10), 1355.

Jordan, M.; Mueller, M.; Kortlepel, R.; Glasmacher, B. Modified Chandler Loop System for Dynamic Hemocompatibility Testing of Vascular Implants. *Biomed Tech (Berlin)* **2014**, *59* (s1), 38–41.

Klaus, S.; Körfer, S.; Mottaghy, K.; Reul, H.; Glasmacher, B. In Vitro Blood Damage by High Shear Flow: Human versus Porcine Blood. *Int. J. Artif. Organs* **2002**, *25* (4), 306–312.

Krings, M.; Kanellopoulou, D.; Koutsoukos, P. G.; Mavrilas, D.; Glasmacher, B. Development of a New Combined Test Setup for Accelerated Dynamic pH-Controlled in Vitro Calcification of Porcine Heart Valves. *Int. J. Artif. Organs* **2009**, *32* (11), 794–801.

Kubota, H.; Ishihara, H.; Langmann, T.; Schmitz, G.; Stieger, B.; Wieser, H.-G.; Yonekawa, Y.; Frei, K. Distribution and Functional Activity of P-Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Proteins in Human Brain Microvascular Endothelial Cells in Hippocampal Sclerosis. *Epilepsy Res.* **2006**, *68* (3), 213–228.

- Ku, D.; Allen, R. Vascular Grafts. *Biomed. Eng. Handb.* **1995**, 1871–1878.
- Kuwabara, F.; Narita, Y.; Yamawaki-Ogata, A.; Satake, M.; Kaneko, H.; Oshima, H.; Usui, A.; Ueda, Y. Long-Term Results of Tissue-Engineered Small-Caliber Vascular Grafts in a Rat Carotid Arterial Replacement Model. *J. Artif. Organs* **2012**, *15* (4), 399–405.
- Lang, F.; Lang, P. *Basiswissen Physiologie*; Springer Medizin Verlag Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007.
- Larsen, C. C.; Kligman, F.; Tang, C.; Kottke-Marchant, K.; Marchant, R. E. A Biomimetic Peptide Fluorosurfactant Polymer for Endothelialization of ePTFE with Limited Platelet Adhesion. *Biomaterials* **2007**, *28* (24), 3537–3548.
- Liu, C.; Xia, Z.; Czernuszka, J. T. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chem. Eng. Res. Des.* **2007**, *85* (7), 1051–1064.
- Liu, H.; Li, X.; Niu, X.; Zhou, G.; Li, P.; Fan, Y. Improved Hemocompatibility and Endothelialization of Vascular Grafts by Covalent Immobilization of Sulfated Silk Fibroin on Poly(lactic-Co-Glycolic Acid) Scaffolds. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (8), 2914–2924.
- Liu, S.; Dong, C.; Lu, G.; Lu, Q.; Li, Z.; Kaplan, D. L.; Zhu, H. Bilayered Vascular Grafts Based on Silk Proteins. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (11), 8991–9003.
- Li, Y.-S. J.; Haga, J. H.; Chien, S. Molecular Basis of the Effects of Shear Stress on Vascular Endothelial Cells. *J. Biomech.* **2005**, *38* (10), 1949–1971.
- Luissint, A.-C.; Artus, C.; Glacial, F.; Ganeshamoorthy, K.; Couraud, P.-O. Tight Junctions at the Blood Brain Barrier: Physiological Architecture and Disease-Associated Dysregulation. *Fluids Barriers CNS* **2012**, *9* (1), 23.
- Lu, S.; Zhang, P.; Sun, X.; Gong, F.; Yang, S.; Shen, L.; Huang, Z.; Wang, C. Synthetic ePTFE Grafts Coated with an Anti-CD133 Antibody-Functionalized Heparin/collagen Multilayer with Rapid in Vivo Endothelialization Properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5* (15), 7360–7369.
- Malek, A. M.; Ahlquist, R.; Gibbons, G. H.; Dzau, V. J.; Izumo, S. A Cone-Plate Apparatus for the in Vitro Biochemical and Molecular Analysis of the Effect of Shear Stress on Adherent Cells. *Methods Cell Sci.* **1995**, *17* (3), 165–176.
- Markl, J.; Sadava, D. *Purves Biologie*; Spektrum der Wissenschaft: Heidelberg, 2011.
- Matter, K.; Balda, M. S. Functional Analysis of Tight Junctions. *Methods* **2003**, *30* (3), 228–234.
- McCann, J. A.; Peterson, S. D.; Plesniak, M. W.; Webster, T. J.; Haberstroh, K. M. Non-Uniform Flow Behavior in a Parallel Plate Flow Chamber Alters Endothelial Cell Responses. *Ann. Biomed. Eng.* **2005**, *33* (3), 328–336.

- Middleton, J. C.; Tipton, A. J. Synthetic Biodegradable Polymers as Orthopedic Devices. *Biomaterials* **2000**, *21* (23), 2335–2346.
- Müller, W. A.; Frings, S.; Möhrle, F. *Tier- und Humanphysiologie*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2015.
- Nagel, T.; Resnick, N.; Atkinson, W. J.; Dewey Jr, C. F.; Gimbrone Jr, M. A. Shear Stress Selectively Upregulates Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Cultured Human Vascular Endothelial Cells. *J. Clin. Invest.* **1994**, *94* (2), 885.
- Naik, P.; Cucullo, L. In Vitro Blood-Brain Barrier Models: Current and Perspective Technologies. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (4), 1337–1354.
- Neuhaus, W.; Bogner, E.; Wirth, M.; Trzeciak, J.; Lachmann, B.; Gabor, F.; Noe, C. R. A Novel Tool to Characterize Paracellular Transport: The APTS–Dextran Ladder. *Pharm. Res.* **2006**, *23* (7), 1491–1501.
- Osborn, E. A. Endothelial Actin Cytoskeleton Remodeling during Mechanostimulation with Fluid Shear Stress. *AJP Cell Physiol.* **2005**, *290* (2), C444–C452.
- Papadaki, M.; Eskin, S. G. Effects of Fluid Shear Stress on Gene Regulation of Vascular Cells. *Biotechnol. Prog.* **1997**, *13* (3), 209–221.
- Papaioannou, T. G.; Stefanadis, C. Vascular Wall Shear Stress: Basic Principles and Methods. *Hell. J. Cardiol. HJC Hellēnikē Kardiologikē Epitheōrēsē* **2005**, *46* (1), 9–15.
- Pardridge, W. M. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **2005**, *2* (1), 3–14.
- Paul, R.; Apel, J.; Klaus, S.; Schügner, F.; Schwindke, P.; Reul, H. Shear Stress Related Blood Damage in Laminar Couette Flow. *Artif. Organs* **2003**, *27* (6), 517–529.
- Pektok, E.; Nottelet, B.; Tille, J.-C.; Gurny, R.; Kalangos, A.; Moeller, M.; Walpoth, B. H. Degradation and Healing Characteristics of Small-Diameter Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Vascular Grafts in the Rat Systemic Arterial Circulation. *Circulation* **2008**, *118* (24), 2563–2570.
- Peña, J.; Román, J.; Victoria Cabañas, M.; Vallet-Regí, M. An Alternative Technique to Shape Scaffolds with Hierarchical Porosity at Physiological Temperature. *Acta Biomater.* **2010**, *6* (4), 1288–1296.
- Pfeiffer, D.; Stefanitsch, C.; Wankhammer, K.; Müller, M.; Dreyer, L.; Krolitzki, B.; Zernetsch, H.; Glasmacher, B.; Lindner, C.; Lass, A.; et al. Endothelialization of Electrospun Polycaprolactone (PCL) Small Caliber Vascular Grafts Spun from Different Polymer Blends. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2014**, *102* (12), 4500–4509.
- Ponche, A.; Dupuis, D. On Instabilities and Migration Phenomena in Cone and Plate Geometry. *J. Non-Newton. Fluid Mech.* **2005**, *127* (2-3), 123–129.

- Pörtner, R.; Nagel-Heyer, S.; Goepfert, C.; Adamietz, P.; Meenen, N. M. Bioreactor Design for Tissue Engineering. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, *100* (3), 235–245.
- Pries, A. R.; Kuebler, W. M. Normal Endothelium. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2006**, No. 176 Pt 1, 1–40.
- Pronk, A.; Leguit, P.; Hoyneck van Papendrecht, A. A.; Hagelen, E.; van Vroonhoven, T. J.; Verbrugh, H. A. A Cobblestone Cell Isolated from the Human Omentum: The Mesothelial Cell; Isolation, Identification, and Growth Characteristics. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* **1993**, *29A* (2), 127–134.
- Ranjan, A. K.; Kumar, U.; Hardikar, A. A.; Poddar, P.; Nair, P. D.; Hardikar, A. A. Human Blood Vessel-Derived Endothelial Progenitors for Endothelialization of Small Diameter Vascular Prosthesis. *PLoS ONE* **2009**, *4* (11), e7718.
- Ratner, B. D. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2nd ed.; Elsevier Academic Press: Amsterdam; Boston, 2004.
- Ratner, B. D. The Catastrophe Revisited: Blood Compatibility in the 21st Century. *Biomaterials* **2007**, *28* (34), 5144–5147.
- Ravi, S.; Chaikof, E. L. Biomaterials for Vascular Tissue Engineering. *Regen. Med.* **2010**, *5* (1), 107–120.
- Rayatpisheh, S.; Poon, Y. F.; Cao, Y.; Feng, J.; Chan, V.; Chan-Park, M. B. Aligned 3D Human Aortic Smooth Muscle Tissue via Layer by Layer Technique inside Microchannels with Novel Combination of Collagen and Oxidized Alginate Hydrogel. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *98A* (2), 235–244.
- Reinitz, A.; DeStefano, J.; Ye, M.; Wong, A. D.; Searson, P. C. Human Brain Microvascular Endothelial Cells Resist Elongation due to Shear Stress. *Microvasc. Res.* **2015**, *99*, 8–18.
- Risau, W. Mechanisms of Angiogenesis. *Nature* **1997**, *386* (6626), 671–674.
- Rittinghaus, T.; Zernetsch, H.; Glasmacher, B. Entwicklung von schichtweise ausgerichteten Faserverbundstrukturen. *Biomed. Tech. (Berl)* **2013**, *58* ((Suppl. 1)).
- Roura, S.; Gálvez-Montón, C.; Bayes-Genis, A. The Challenges for Cardiac Vascular Precursor Cell Therapy: Lessons from a Very Elusive Precursor. *J. Vasc. Res.* **2013**, *50* (4), 304–323.
- Santaguida, S.; Janigro, D.; Hossain, M.; Oby, E.; Rapp, E.; Cucullo, L. Side by Side Comparison between Dynamic versus Static Models of Blood-Brain Barrier in Vitro: A Permeability Study. *Brain Res.* **2006**, *1109* (1), 1–13.
- Santos, I. C.; Rodrigues, A.; Figueiredo, L.; Rocha, L. A.; Tavares, J. M. R. Mechanical Properties of Stent-Graft Materials. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part J. Mater. Des. Appl.* **2012**, *226* (4), 330–341.



- Sarkar, S.; Sales, K. M.; Hamilton, G.; Seifalian, A. M. Addressing Thrombogenicity in Vascular Graft Construction. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2007**, *82* (1), 100–108.
- Scharr, H. Optimal Filters for Extended Optical Flow. In *Complex Motion*; Jähne, B., Mester, R., Barth, E., Scharr, H., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007; Vol. 3417, pp 14–29.
- Schmidt, R. F.; Lang, F. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*; Springer Medizin Verlag Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007.
- Schnittler, H.-J.; Franke, R. P.; Akbay, U.; Mrowietz, C.; Drenckhahn, D. Improved in Vitro Rheological System for Studying the Effect of Fluid Shear Stress on Cultured Cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **1993**, *265* (1), C289–C298.
- Sdougos, H. P.; Bussolari, S. R.; Dewey, C. F. Secondary Flow and Turbulence in a Cone-and-Plate Device. *J. Fluid Mech.* **1984**, *138* (-1), 379.
- Seifalian, A. M.; Tiwari, A.; Hamilton, G.; Salacinski, H. J. Improving the Clinical Patency of Prosthetic Vascular and Coronary Bypass Grafts: The Role of Seeding and Tissue Engineering. *Artif. Organs* **2002**, *26* (4), 307–320.
- Sell, S. A.; McClure, M. J.; Barnes, C. P.; Knapp, D. C.; Walpoth, B. H.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. Electrospun Polydioxanone–elastin Blends: Potential for Bioresorbable Vascular Grafts. *Biomed. Mater.* **2006**, *1* (2), 72–80.
- Sell, S. A.; Wolfe, P. S.; Ericksen, J. J.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. Incorporating Platelet-Rich Plasma into Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng. Part A* **2011**, *17* (21-22), 2723–2737.
- Shi, Z.-D.; Tarbell, J. M. Fluid Flow Mechanotransduction in Vascular Smooth Muscle Cells and Fibroblasts. *Ann. Biomed. Eng.* **2011**, *39* (6), 1608–1619.
- Sivalingam, G.; Chattopadhyay, S.; Madras, G. Solvent Effects on the Lipase Catalyzed Biodegradation of Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) in Solution. *Polym. Degrad. Stab.* **2003**, *79* (3), 413–418.
- Soletti, L.; Nieponice, A.; Guan, J.; Stankus, J. J.; Wagner, W. R.; Vorp, D. A. A Seeding Device for Tissue Engineered Tubular Structures. *Biomaterials* **2006**, *27* (28), 4863–4870.
- Speckmann, E.-J. *Physiologie: mit 92 Tabellen*; Elsevier, Urban & Fischer: München, 2008.
- Sriyab, S. Mathematical Analysis of Non-Newtonian Blood Flow in Stenosis Narrow Arteries. *Comput. Math. Methods Med.* **2014**, *2014*, 1–10.
- Sugawara, Y.; Miyata, T.; Sato, O.; Kimura, H.; Namba, T.; Makuuchi, M. Rapid Postincubation Endothelial Retention by Dacron Grafts. *J. Surg. Res.* **1997**, *67* (2), 132–136.

Szentivanyi, A. Struktureinfluss elektrogesponnener Feinstfasermatten auf die Gewebeneubildung, PZH, Produktionstechnisches Zentrum: Garbsen, **2012**.

Szentivanyi, A.; Chakradeo, T.; Zernetsch, H.; Glasmacher, B. Electrospun Cellular Microenvironments: Understanding Controlled Release and Scaffold Structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011a**, *63* (4-5), 209–220.

Szentivanyi, A. L.; Zernetsch, H.; Menzel, H.; Glasmacher, B. A Review of Developments in Electrospinning Technology: New Opportunities for the Design of Artificial Tissue Structures. *Int. J. Artif. Organs* **2011b**, *34* (10), 986–997.

Taher, F.; Assadian, O.; Hirsch, K.; Falkensammer, J.; Senekowitsch, C.; Assadian, A. Protheseninfektionen im aortofemorale Bereich und ihre Vermeidung. *Chir.* **2015**.

Tarbell, J. M. Shear Stress and the Endothelial Transport Barrier. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *87* (2), 320–330.

Teebken, O. E.; Haverich, A. Tissue Engineering of Small Diameter Vascular Grafts. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2002**, *23* (6), 475–485.

Teebken, O. E.; Wilhelmi, M.; Haverich, A. Tissue Engineering für Herzklappen und Gefäße. *Chir.* **2005**, *76* (5), 453–466.

Ting, L. H.; Jahn, J. R.; Jung, J. I.; Shuman, B. R.; Feghhi, S.; Han, S. J.; Rodriguez, M. L.; Sniadecki, N. J. Flow Mechanotransduction Regulates Traction Forces, Intercellular Forces, and Adherens Junctions. *AJP Heart Circ. Physiol.* **2012**, *302* (11), H2220–H2229.

Tiwari, A.; Salacinski, H. J.; Hamilton, G.; Seifalian, A. M. Tissue Engineering of Vascular Bypass Grafts: Role of Endothelial Cell Extraction. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2001**, *21* (3), 193–201.

De Valence, S.; Tille, J.-C.; Mugnai, D.; Mrowczynski, W.; Gurny, R.; Möller, M.; Walpoth, B. H. Long Term Performance of Polycaprolactone Vascular Grafts in a Rat Abdominal Aorta Replacement Model. *Biomaterials* **2012**, *33* (1), 38–47.

De Visscher, G.; Mesure, L.; Meuris, B.; Ivanova, A.; Flameng, W. Improved Endothelialization and Reduced Thrombosis by Coating a Synthetic Vascular Graft with Fibronectin and Stem Cell Homing Factor SDF-1 $\alpha$ . *Acta Biomater.* **2012**, *8* (3), 1330–1338.

Walpoth, B. H. Vascular Organogenesis: Dream or Reality? *Organogenesis* **2010**, *6* (3), 158–160.

Walpoth, B. H.; Möller, M. Tissue Engineering von Gefäßprothesen. *Chir.* **2011**, *82* (4), 303–310.

Walsh, T. G.; Murphy, R. P.; Fitzpatrick, P.; Rochfort, K. D.; Guinan, A. F.; Murphy, A.; Cummins, P. M. Stabilization of Brain Microvascular Endothelial Barrier Function by Shear Stress Involves VE-Cadherin Signaling Leading to Modulation of pTyr-Occludin Levels. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226* (11), 3053–3063.

- Warboys, C. M.; Eric Berson, R.; Mann, G. E.; Pearson, J. D.; Weinberg, P. D. Acute and Chronic Exposure to Shear Stress Have Opposite Effects on Endothelial Permeability to Macromolecules. *AJP Heart Circ. Physiol.* **2010**, *298* (6), H1850–H1856.
- Wight, T. N. Cell Biology of Arterial Proteoglycans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1989**, *9* (1), 1–20.
- Wilhelm, I.; Fazakas, C.; Krizbai, I. A. In Vitro Models of the Blood-Brain Barrier. *Acta Neurobiol Exp Wars* **2011**, *71* (1), 113–128.
- Wilhelmi, M.; Jockenhoevel, S.; Mela, P. Bioartificial Fabrication of Regenerating Blood Vessel Substitutes: Requirements and Current Strategies. *Biomed. Tech. (Berl)* **2014**, *59* (3), 185–195.
- Williams, D. F. Regulatory Biocompatibility Requirements for Biomaterials Used in Regenerative Medicine. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26* (2).
- Williams, S. K.; Schneider, T.; Kapelan, B.; Jarrell, B. E. Formation of a Functional Endothelium on Vascular Grafts. *J. Electron Microsc. Tech.* **1991**, *19* (4), 439–451.
- Wong, A. D.; Ye, M.; Levy, A. F.; Rothstein, J. D.; Bergles, D. E.; Searson, P. C. The Blood-Brain Barrier: An Engineering Perspective. *Front. Neuroengineering* **2013**, *6*, 7.
- Wood, J.; Garthwaite, J. Models of the Diffusional Spread of Nitric Oxide: Implications for Neural Nitric Oxide Signalling and Its Pharmacological Properties. *Neuropharmacology* **1994**, *33* (11), 1235–1244.
- Ye, M.; Sanchez, H. M.; Hultz, M.; Yang, Z.; Bogorad, M.; Wong, A. D.; Searson, P. C. Brain Microvascular Endothelial Cells Resist Elongation due to Curvature and Shear Stress. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4681.
- Yoshigi, M.; Clark, E. B.; Yost, H. J. Quantification of Stretch-Induced Cytoskeletal Remodeling in Vascular Endothelial Cells by Image Processing. *Cytometry* **2003**, *55A* (2), 109–118.
- Yuan, Y.; Zhang, P.; Yang, Y.; Wang, X.; Gu, X. The Interaction of Schwann Cells with Chitosan Membranes and Fibers in Vitro. *Biomaterials* **2004**, *25* (18), 4273–4278.
- Zernetsch, H.; Repanas, A.; Gryshkov, A.; Al Halabi, F.; Rittinghaus, T.; Wienecke, S.; Müller, M.; Glasmacher, B. Solving Biocompatibility Layer by Layer: Designing Scaffolds for Tissues. *Biomed. Tech. (Berl)* **2013**, *58* ((Suppl. 1)).
- Zhao, J.; Qiu, H.; Chen, D.; Zhang, W.; Zhang, D.; Li, M. Development of Nanofibrous Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *56*, 106–113.
- Zheng, W.; Wang, Z.; Song, L.; Zhao, Q.; Zhang, J.; Li, D.; Wang, S.; Han, J.; Zheng, X.-L.; Yang, Z.; et al. Endothelialization and Patency of RGD-Functionalized Vascular Grafts in a Rabbit Carotid Artery Model. *Biomaterials* **2012**, *33* (10), 2880–2891.

## Lebenslauf

Lutz Dreyer,

geb. am 17.05.1985 in Hannover

## Ausbildung

2004	Abitur am Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Hannover
2004-2005	Fächerübergreifender Studiengang Biologie und Mathematik an der Hochschule Vechta
2005-2008	Studiengang Biologie an der Universität Hannover, Abschluss mit dem Bachelor of Science, Note 1,8
2008-2011	Studiengang „Animal Biology and Biomedical Sciences“ an der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Abschluss mit dem Master of Science, Note 1,4
2009	Erwerb der Bescheinigung FELASA-C für die Leitung und Durchführung von Tierversuchen
Seit 2011	Promotionsstudium am Institut für Mehrphasenprozesse und am Institut für Biophysik, Leibniz Universität Hannover

## Auszeichnungen

2009	Stipendium des DAAD für ein dreimonatiges Praktikum an der American University of Beirut, Libanon
2012	Stipendium des DAAD für das Annual Meeting der American Society for Cell Biology, San Francisco, USA
2014	Promotionsabschlussförderung der Graduiertenakademie der Leibniz Universität Hannover

## Publikationsliste

Duda S, **Dreyer L**, Behrens P, Wienecke S, Chakradeo T, Glasmacher B, Haastert-Talini K.: "Massive Foreign Body Reaction and Impairs Axonal Regeneration through 3D Multichannel Chitosan Nerve Guides." *Biomed Res Int*. 2014;2014:835269.

Pfeiffer D, Stefanitsch C, Wankhammer K, Müller M, **Dreyer L**, Krolitzki B, Zernetsch H, Glasmacher B, Lindner C, Lass A, Schwarz M, Muckenauer W, Lang I. "Endothelialization of electrospun polycaprolactone (PCL) small caliber vascular grafts spun from different polymer blends." *J Biomed Mater Res A*. 2014 Feb 14.

Begandt D, Bader A, Gerhard L, Lindner J, **Dreyer L**, Schlingmann B, Ngezahayo A: "Dipyridamole-related enhancement of gap junction coupling in the GM-7373 aortic endothelial cells correlates with an increase in the amount of connexin 43 mRNA and protein as well as gap junction plaques." *J Bioenerg Biomembr*. 2013 Aug;45(4):409-19.

Begandt D, Bader A, **Dreyer L**, Eisert N, Reeck T, Ngezahayo A: Biphasic increase of gap junction coupling induced by dipyridamole in the rat aortic A-10 vascular smooth muscle cell line." *J Cell Commun Signal*. 2013 Jun; 7(2):151-60.

**Dreyer L**, Krolitzki B, Autschbach R, Vogt P, Welte T, Ngezahayo A, Glasmacher B: "An Advanced Cone-And-Plate Reactor for the in vitro-Application of Shear Stress on Adherent Cells." *Clin Hemorheol Microcirc*. 2011 Jan 1;49(1):391-7.

Bintig W, Begandt D, Schlingmann B, Gerhard L, Pangalos M, **Dreyer L**, Hohnjec N, Couraud PO, Romero IA, Weksler BB, Ngezahayo A: "Purine receptors and Ca(2+) signaling in the human blood-brain barrier endothelial cell line hCMEC/D3." *Purinergic Signal*. 2012 Mar;8(1):71-80.

Meyer D, Seth S, Albrecht J, Maier MK, du Pasquier L, Ravens I, **Dreyer L**, Burger R, Gramatzki M, Schwitzer R, Kremmer E, Foerster R, Bernhardt G.: "CD96 interaction with CD155 via its first Ig-like domain is modulated by alternative splicing or mutations in distal Ig-like domains" *J Biol Chem*. 2009 Jan 23;284(4):2235-44.

Clinical Hemorheology and Microcirculation 49 (2011) 391–397  
DOI 10.3233/CH-2011-1488  
IOS Press

391

# An advanced cone-and-plate reactor for the *in vitro*-application of shear stress on adherent cells

Lutz Dreyer<sup>a,b,1</sup>, Benjamin Krolitzki<sup>a,1</sup>, Rüdiger Autschbach<sup>c</sup>, Peter Vogt<sup>d</sup>, Tobias Welte<sup>e</sup>, Anaclét Ngezahayo<sup>b</sup> and Birgit Glasmacher<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Institute for Multiphase Processes, Leibniz University Hannover, Hannover, Germany*

<sup>b</sup>*Institute for Biophysics, Leibniz University Hannover, Hannover, Germany*

<sup>c</sup>*Department of Cardiac and Thorax Surgery, University Hospital Aachen, Aachen, Germany*

<sup>d</sup>*Department of Plastic, Hand and Reconstructive Surgery, Hannover Medical School, Hannover, Germany*

<sup>e</sup>*Clinic for Pneumology, Hannover Medical School, Hannover, Germany*

**Abstract.** Endothelial cells (ECs) are permanently exposed to the blood flow and the resulting shear stress, its magnitude varying with the EC site in the blood stream. Along with other mechanical stimuli like vessel wall stretching or hydrostatic blood pressure, this shear stress modulates the endothelial cell function, morphology and gene expression.

Here, we describe our improved cone-and-plate reactor that applies up to 10 dyn/cm<sup>2</sup> uniform wall shear stress on a defined, ring-shaped region on a culture dish. At the same time, a hydrostatic pressure of up to 195 mmHg can be applied by increasing the atmospheric pressure in the incubator box. Gas composition can be controlled additionally, used for maintaining CO<sub>2</sub>-homeostasis or inducing hypoxic conditions. For better comparability, six cone-and-plate systems can be used at the same time at different rotational velocities. The effects on cell morphology, cytoskeleton and cell alignment can be monitored during application using a laser scanning microscope.

Flow conditions have been studied and a sufficient area of uniform wall shear stress could be shown. To exceed 10 dyn/cm<sup>2</sup>, we suggest an increase in medium viscosity.

Keywords: shear force, cone-and-plate rheometer, mechanotransduction, endothelial cells

## 1. Introduction

The inner surface of the blood vessels in the body is lined by the endothelium, a monolayer of endothelial cells (EC). These cells form a smooth surface and allow a laminar blood flow by reducing turbulence and by inhibiting the blood coagulation. Through cellular signaling, ECs control the contraction of the smooth muscle cells, which in turn controls the vasoconstriction and -dilation. Thus, the ECs regulate the blood circulation and blood pressure. In addition, they act as a barrier which regulates transport processes, varying from the leaky endothelia of microcapillaries in most tissues to the tight blood brain barrier in the

<sup>1</sup>Both authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Prof. Dr.-Ing. Birgit Glasmacher, M.Sc., Institute for Multiphase Processes, Leibniz University Hannover, Callinstr. 36, 30176 Hannover, Germany. Tel.: +49 511 762 3828; Fax: +49 511 762 3031; E-mail: glasmacher@imp.uni-hannover.de.

nervous tissue (see review [13]). Moreover, the endothelial cells respond to highly complex physiological processes related to inflammation or to diseases like atherosclerosis, as well as to angiogenesis [11, 18].

To fulfill their various functions, the endothelial cells adapt to the permanent exposure to mechanical forces that are caused by the blood stream, such as hydrostatic pressure, wall stretch and shear stress. In this aspect, it has been shown that the endothelial cells respond to these forces in time- and dose-dependent changes of morphology, physiology and gene expression [3, 9, 10]. Several cellular receptors have been proposed to perceive these forces (see review [19]). In the past decades, there has been a high interest in analysis of the cellular response to shear stress.

There are commercially available or custom-made devices that have been used in past studies to overcome the limitations of *in vivo* experiments. All these devices are based on bio-reactors that apply defined forces on the cells.

Although original-scale anatomical models [4] or tube-shaped flow devices [14] have been used, most studies rely on flow chambers or cone-and-plate rheometers. Flow chambers are based on a simple principle, usually with a rectangular cross-section and an even plate for cell seeding. Shear stress is applied by simply perfusing the system at a set volumetric flow. Flow, and thus shear stress on the cells, is assumed to be uniform throughout the chamber, except for its boundaries. Mounted onto a microscope, live-cell-imaging allows a monitoring of the cellular response during shear stress application. However, McCann et al. [8] showed a non-uniform flow behavior in a rectangular flow chamber using  $\mu$ -particle image velocimetry ( $\mu$ PIV), a method, which visualizes fluid flow by tracking fluorescent particles. Anderson et al. [1] examined flow characteristics of three different commercially available flow chambers using computer simulations and  $\mu$ PIV. For all three chambers tested, the flow was inhomogeneous, resulting in inaccurate shear rate assumptions. Moreover, it is difficult to compare studies with devices from different manufacturers since the shear force in these chambers depends on the chamber geometry.

As a consequence, the cone-and-plate principle derived from viscosimetry became frequently used in shear stress application on cells (Fig. 1). Shear rate is uniform across the flow field in a cone-and-plate setup, assuming that Stokes flow conditions are met. In this case, centrifugal forces are negligible compared to the viscous forces inside the fluid.

The relation between rotational speed and rim shear stress is given as

$$\tau = \frac{\omega r}{h_0 + r \tan \alpha} \quad (1)$$

with  $\tau$  being the rim shear stress,  $\omega$  the rotational speed,  $r$  the radius,  $h_0$  the distance between the cone tip and the plate and  $\alpha$  the cone angle [6, 12].

Secondary radial flow will occur with increasing rotational speed as needed for physiologically relevant shear stress [17]. However, this flow has been found to be three-dimensionally laminar and steadily progressing, up to certain Reynolds numbers. At higher rotational speeds, completely turbulent flow will emerge [2, 5]. Analyses for cone angles between  $2^\circ$  and  $4^\circ$  have shown that two transitions from Stokes flow to secondary flow and to fully turbulent flow occur at similar (modified) Reynolds numbers [7]:

$$\tilde{R} = \frac{\text{centrifugal force}}{\text{viscosity force}} = \frac{r^2 \omega \alpha^2}{12\nu} \quad (2)$$

with  $\nu$  being the kinematic viscosity of the fluid. At  $\tilde{R} \geq 0.5$ , flow will exhibit turbulent components and at  $\tilde{R} \geq 4$ , a fully turbulent flow is predicted [16]. As long as Reynolds numbers stay below transition point to fully turbulent, Fewell's equations can be used to determine a correction factor for the resulting shear stress from superimposed secondary flow [6].

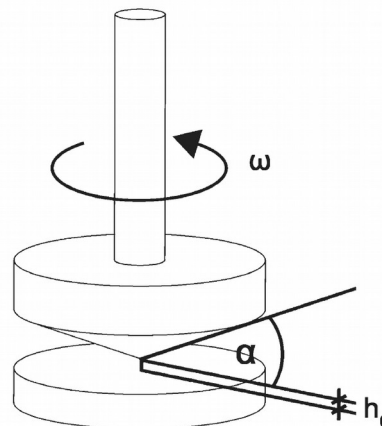


Fig. 1. Principle of the plate-and-cone shear reactor. Wall shear stress depends on the rotational speed  $\omega$ , the cone angle  $\alpha$ , the distance between the tip of the cone and the plate  $h_0$  and the fluid viscosity  $\eta$ .

## 2. An improved shear reactor

The reactor chassis is milled from a solid block of aluminum and holds six stainless steel cones, individually driven by brushless servo motors with internal speed monitoring. Cone diameter was chosen to be 19 mm with a surface inclination of  $2.4^\circ$ .

The layout is designed to match a standard six-well cell culture plate, alternatively six single culture dishes ( $\mu$ -Dish 35 mm, Ibidi, Martinsried, Germany). The reactor is housed in an incubation chamber made of sterilizable polycarbonate (Fig. 2A). The temperature inside the wells is kept constant by means of a fan heater and a heated specimen holder. The temperature of every well is monitored with a temperature probe, additional temperature probes can be placed anywhere in the reactor housing. The program automatically logs temperature readings from all probes connected to the controlling computer via A/D converter.

5%  $\text{CO}_2$ -Atmosphere is required to maintain pH in the culture medium. In our chamber, this was achieved using a four-way gas mixer, which can also control the nitrogen and oxygen concentration.

Atmospheric pressure in the box and thus hydrostatic pressure on the cells can be increased up to 0.26 bar ( $\sim 195$  mmHg), representing pathological blood pressure. An integrated perfusion system provides the possibility to exchange culture medium or modify its composition for individual wells (see Fig. 2B for a schematic diagram).

The reactor can be mounted on a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 510 Meta) which allows for live-cell imaging during the application of shear stress. The microscope is also used to set the cone-plate distance  $h_0$  (see Fig. 1).

## 3. Validation of the system

The bio-reactor was tested in presence and absence of cells. Flow mechanics testing was conducted in cell free water, but the employed cell culture medium had a slightly higher kinematic viscosity than water. Using  $\tilde{R}$  and threshold-values found by Sdougos [15], laminar flow occurs up to  $10 \text{ dyn/cm}^2$ , laminar flow with turbulent compounds up to  $70 \text{ dyn/cm}^2$ .



394

L. Dreyer et al. / An advanced cone-and-plate reactor

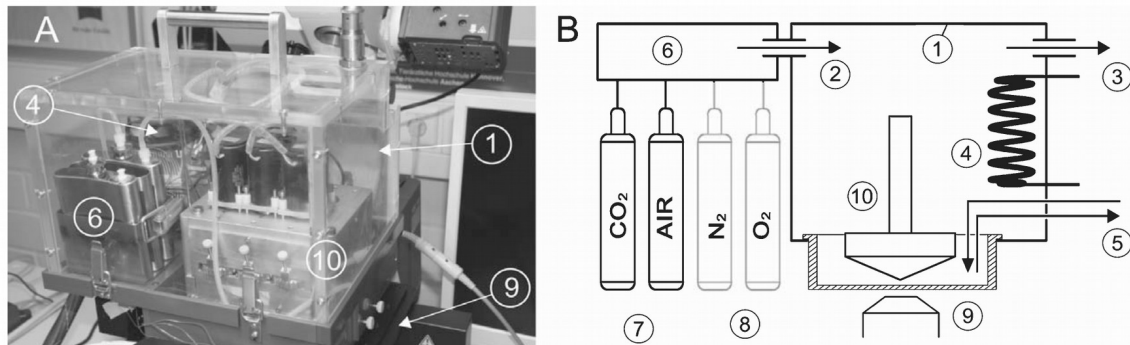


Fig. 2. Photographic (A) and schematic (B) image of the shear reactor setup. The shear reactor is housed in a polycarbonate incubator (1) with a gas in- and outlet (2, 3), a heating device (4) and a medium perfusion system (5). Constant gas flow at 5% CO<sub>2</sub> is provided by a 4-way gas-mixer and humidifier (6) with bottled CO<sub>2</sub> and pressurized air attached (7). Nitrogen and oxygen (8) can be connected to the mixer if required. The system is mounted on a confocal laser scanning microscope (9).

Flow in the cone-and-plate system is required to be laminar for a uniform and predictable shear rate. Here, two methods were used to confirm laminarity: (i) the dye dissolution method and (ii) PIV experiments.

To visualize flow conditions close to the ground base plate, we monitored the dissolution of a dried, water soluble dye spot (Fig. 3A). A pattern of concentric circles could be seen for smaller diameters. Nevertheless, according to theoretical analyses and PIV flow, this inner area close to the apex must not be considered as laminar. A slow inward spiraling movement was seen at higher cone velocities in the area  $\geq 1/3$  of the radius (Fig. 3B). Here, laminar secondary flow occurs at the ground, which has been described before (15) is caused by stable three-dimensional vortices [5]. This secondary flow could be quantified by measuring the change in radius ( $\Delta$  radius) over an angle of 45° (Fig. 4).

In this dye experiments, only wall shear rates up to  $\sim 15$  dyn/cm<sup>2</sup> were tested, since the dye dissolution could not be monitored at higher speeds. The results showed that there is no disruption of the laminar flow by the inner, potentially turbulent area.

For a similar cone-and-plate system, Buschmann et al. showed that there is a region of almost constant shear stress at greater than 1/3 of the radius, using computed models [2]. He remarked that detailed information about flow conditions can only be obtained possible in simulations.

Using PIV measurements with an original-scale model, flow conditions in the gap can be empirically estimated (Fig. 5). This system is limited by the breadth of the illuminating laser sheet, which was 0.5 mm in our case thus exiting fluorescent particles in the whole gap, instead of the lowest laminar layer. Nevertheless, a laminar flow could be shown for shear rates up to 10 dyn/cm<sup>2</sup>. The innermost region with radius < 5 mm could not be proved as laminar.

#### 4. Discussion and outlook

Along with other mechanical stimuli like vessel wall stretching or hydrostatic blood pressure, this shear stress modulates the endothelial cell function, morphology and gene expression. Here, we used a cone-and-plate reactor to study the effects of precisely defined shear stress in the range of 1 to 10 dyne/cm<sup>2</sup> on different cell lines.

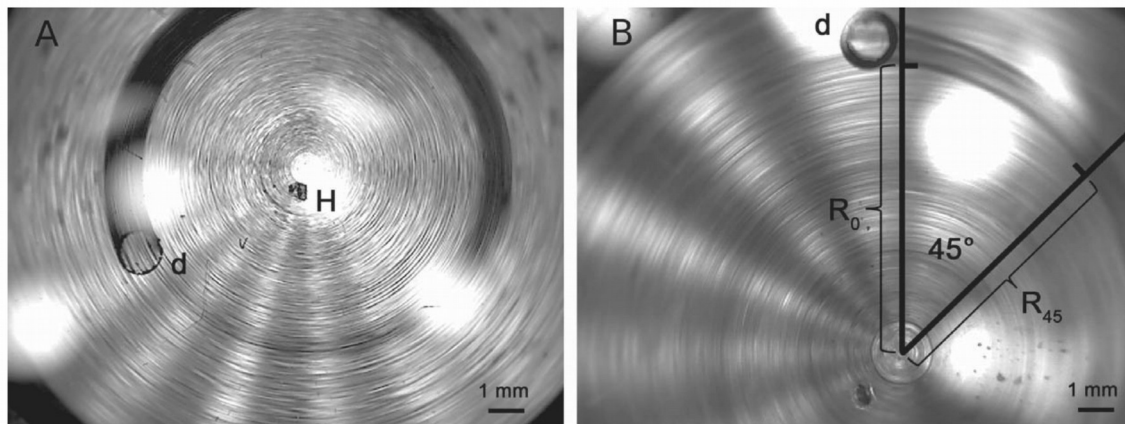


Fig. 3. Demonstration of laminar flow. A small portion of coomassie blue was placed on the culture dish. Shortly after filling the system with water, the dissolving dye visualizes flow lines.  $10 \text{ dyn/cm}^2$  were applied; light reflections (white spots) could not be avoided in this macroscopic image of the culture dish. d: dye spot, H: small hole drilled into the dish bottom to allow the filling of the dry system during operation (A). Measurement of inward flow as a function of radius. d, dye spot,  $R_0$ , distance of dye comet tail to center at  $0^\circ$ ,  $R_{45}$ , distance to center at  $45^\circ$  (B).

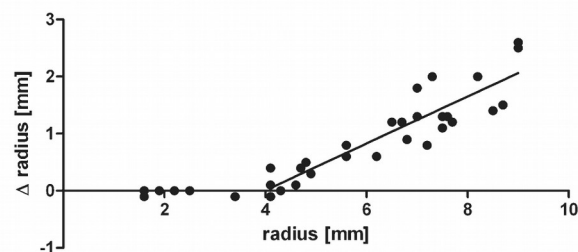


Fig. 4. Inward flow as a function of radius. Beginning at a radius of approximately 4 mm, an inward spiraling flow caused by secondary currents was observed, shown here as difference in radius over an angle of  $45^\circ$  ( $\Delta \text{ radius} = R_0 - R_{45}$ ). No considerable stirring flow occurs between inner and outer zone.  $n = 14$  experiments at  $10 \text{ dyn/cm}^2$ , linear regression of values  $> 4 \text{ mm}$ , Coefficient of determination  $R^2 = 0.81$ .

An improved sterilizable shear reactor that can be pressurized and ventilated with defined gas composition was designed and validated. For physiological wall shear rates in the area of a radius  $> 4 \text{ mm}$  (representing more than 80% of the dish surface), up to  $10 \text{ dyn/cm}^2$ , a laminar secondary flow stays within acceptable limits. PIV and dye tracking methods showed that this shear stress up to  $10 \text{ dyn/cm}^2$  can be uniformly applied. There is evidence from our PIV studies as well as supported by other studies [5] that the inner region should be excluded from consideration because of flow uncertainties.

The reactor, other than the commonly used flow chamber, allows application of highly laminar and uniform flow on culture dishes. In addition, independently controllable partial pressures of  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  and  $\text{N}_2$  can simulate different hydrostatic pressures and different physiological gas composition.

To investigate greater shear stresses, change of the medium viscosity is preferred to avoid turbulent secondary flow. For instance, the polymer polyvinylpyrrolidone could be shown not to have an impact on cultured cells, but increases medium viscosity and thus wall shear forces more than sixfold [2].

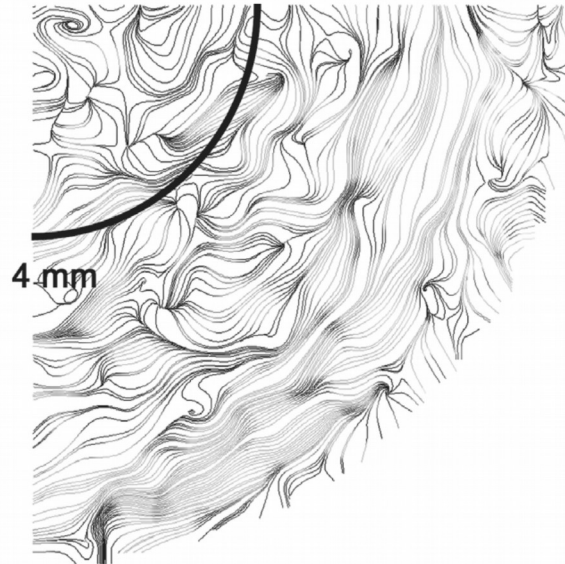


Fig. 5. PIV (particle image velocimetry) representation of the flow conditions in the cone-and-plate system, quarter section of the culture dish. In the region above a radius of 4 mm, laminar flow occurs at a wall shear stress of  $10 \text{ dyn/cm}^2$ . A Nd:YAG laser was used to illuminate the complete gap, polyamide beads ( $1.8 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  PSP-5, Dantec Dynamics) were used to visualize flow.

The effects on cell morphology, cytoskeleton and adhesion molecules, that in turn influence cellular adherence and gap junctional intercellular communication (GJIC), can be studied. To evaluate effects on cellular communication after exposure, dye transfer, nanoparticle uptake and patch-clamp experiments will be used to investigate the effects on cellular communication.

### Acknowledgments

We would like to thank Tanmay Chakradeo and Daniel Gottschalk and our students Martin Grüne and Andreas Reindl for their technical and experimental support.

This work was kindly financially supported by the German Research Foundation (DFG) within the Collaborative Research Area SFB/TR 36 “Micro and nanosystems in medicine – Reconstruction of biological functions”.

### References

- [1] E.J. Anderson, T.D. Falls, A.M. Sorkin and M.L. Knothe Tate, The imperative for controlled mechanical stresses in unraveling cellular mechanisms of mechanotransduction, *Biomedical Engineering Online* **5** (2006), 27.
- [2] M.H. Buschmann, P. Dieterich, N.A. Adams and H. Schnittler, Analysis of flow in a cone-and-plate apparatus with respect to spatial and temporal effects on endothelial cells, *Biotechnology and Bioengineering* **89** (2005), 493–502.
- [3] P.F. Davies, Flow-mediated endothelial mechanotransduction, *Physiological Reviews* **75** (1995), 519–560.
- [4] M.A. Farcas, L. Rouleau, R. Fraser and R.L. Leask, The development of 3-D, *in vitro*, endothelial culture models for the study of coronary artery disease, *Biomedical Engineering Online* **8** (2009), 30.

- [5] M.E. Fewell and J.D. Hellums, The secondary flow of newtonian fluids in cone-and-plate viscometers, *Transactions of the society of rheology* (1977), 535–565.
- [6] R. Jackson and A. Kaye, The measurement of the normal stress differences in a liquid undergoing simple shear flow using a cone-and-plate total thrust apparatus only, *Brit J Appl Phys* **17** (1966), 1355.
- [7] A.M. Malek, R. Ahlquist, G.H. Gibbons, J.D. Dzau and S. Izumo, A cone-plate apparatus for the *in vitro* biochemical and molecular analysis of the effect of shear stress on adherent cells, *Methods in Cell Science* **17** (1995), 165–176.
- [8] J.A. McCann, S.D. Peterson, M.W. Plesniak, T.J. Webster and K.M. Haberstroh, Non-uniform flow behavior in a parallel plate flow chamber: Alters endothelial cell responses, *Annals of Biomedical Engineering* **33** (2005), 328–336.
- [9] J. Müller-Marschhausen, D. Waschke and D. Drenckhahn, Physiological hydrostatic pressure protects endothelial monolayer integrity, *American Journal of Physiology, Cell Physiology* **294** (2008), C324–C332.
- [10] H. Nakadate, H. Minamitani and S. Aomura, Combinations of hydrostatic pressure and shear stress influence morphology and adhesion molecules in cultured endothelial cells, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* (2010), 3812–3815.
- [11] M. Pate, V. Damarla, D.S. Chi, S. Negi and G. Krishnaswamy, Endothelial cell biology: Role in the inflammatory response, *Advances in Clinical Chemistry* **52** (2010), 109–130.
- [12] A. Ponche and D. Dupuid, On instabilities and migration phenomena in cone and plate geometry, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* **127**(2-3) (2005), 123–129.
- [13] A.R. Pries and W.M. Kuebler, Normal endothelium, *Handb Exp Pharmacol* **176** Pt.1 (2006), 1–40.
- [14] Y. Reichenberg and Y. Lanir, A flow bio-reactor for studying the effects of haemodynamic forces on the morphology and rheology of cylindrically cultured endothelial cells, *Journal of Medical Engineering & Technology* **35** (2011), 231–238.
- [15] H.J. Schnittler, R.P. Franke, U. Akbay, C. Mrowietz and D. Drenckhahn, Improved *in vitro* rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells, *The American Journal of Physiology* **265** (1993), C289–C298.
- [16] H. P. Sdougos, S. R. Bussolari and C. F. Dewey, Secondary flow and turbulences in a cone-and-plate device, *Journal of Fluid Mechanics* **138** (1984), 379–404.
- [17] H. Shankaran and S. Neelamegham, Effect of secondary flow on biological experiments in the cone-plate viscometer: Methods for estimating collision frequency, wall shear stress and inter-particle interactions in non-linear flow, *Biorheology* **38** (2001), 275–304.
- [18] P.M. Silva, From endothelial dysfunction to vascular occlusion: Role of the renin-angiotensin system, *Portuguese Journal of Cardiology: An Official Journal of the Portuguese Society of Cardiology* **29** (2010), 801–824.
- [19] K. Yamamoto and J. Ando, Molecular mechanisms underlying mechanosensing in vascular biology, *Mechanosensing Biology* (2011), 21–38.

***Fluid shear stress changes morphology, but exerts no influence  
on epithelial barrier properties of cerebral endothelial cells***

Lutz Dreyer<sup>a,b</sup>, Daniela Begandt<sup>a</sup>, Almke Bader<sup>a</sup>, Birgit Glasmacher<sup>b</sup>, Anaclet Ngezahayo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biophysics, Leibniz Universität Hannover, Herrenhäuserstr. 2, 30419 Hannover, Germany

<sup>b</sup> Institute for Multiphase Processes, Leibniz Universität Hannover, Callinstraße 36, 30167 Hannover, Germany

Address for correspondence: Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo

Institute of Biophysics, Leibniz Universität Hannover, Herrenhäuser Str. 2, 30419, Hannover, Germany

phone: +49 511 762 4568, fax: +49 511 762 2606

[ngezahayo@biophysik.uni-hannover.de](mailto:ngezahayo@biophysik.uni-hannover.de)

## Introduction:

The blood brain barrier (BBB) is an effective protection mechanism that is built by the brain capillary epithelium. Despite its large surface area of  $\sim 20 \text{ m}^2$  and endothelial thickness of only 200 nm [1], it is highly effective in protecting the brain from toxic substances in the blood. It maintains ion and solute homeostasis of the central nervous system, ensuring proper neuronal function [2]. This is achieved by the BBB dual function, consisting of active transport and barrier properties [3]. The presence of mostly brain-specific transporters ensures metabolite exchange with the blood circulation and controls brain milieu, but also actively counteracts transport of potential harmful substances into the brain. Prominent transporters are multidrug resistance proteins and P-glycoproteins [4]. Such strict control of transcellular transport can only be effective, when paracellular transport is physically blocked. On that account, endothelial cell-cell-contacts are sealed with tight junctions that block paracellular diffusion and separate the apical from the basolateral membrane.

A decrease of BBB permeability has been reported after traumatic brain injury, ischemic stroke or inflammation. Furthermore it is associated with the pathology of various diseases like Alzheimer's, multiple sclerosis, epilepsy, ALS, Parkinson's, brain tumors or brain edema [5–7]. In order to study BBB related diseases and enable drug development, great efforts have been undertaken to create an *in vitro* BBB model. Models showing more than  $150\text{-}200 \text{ }\Omega\text{cm}^2$  of trans-epithelial electrical resistance (TEER) have been considered as suitable for solute and drug transport studies, although TEER values in the range of  $1500\text{-}2000 \text{ }\Omega\text{cm}^2$  were found *in vivo* [6].

The endothelial BBB phenotype is maintained and induced by astrocytes, pericytes, neurons and the extracellular matrix; together they form the neurovascular unit [5]. For this reason, many BBB models include glial cells, although Cucullo et al. suggested that in a dynamic BBB model without the presence of astrocytes TEER values above  $1000 \Omega\text{cm}^2$  could be achieved using hCMEC/D3 brain endothelial cells [8]. In comparison, values around  $70 \Omega\cdot\text{cm}^2$  were found in the conventional transwell system.

Evidence for flow induced blood brain barrier formation is mixed. The same group stated that using flow in a 3-D cell culture microcapillary array increases BBB model TEER by more than 10-fold in endothelial/glial (BAEC and C6 cells) co-culture [9] as well as in hCMEC/D3 monoculture [8]. However, other groups reported an increase of only around 30 % when using high shear stress vs static [10] or even similar values in comparison to transwell experiments [11]. On the molecular level, shear has been shown to increase tight junction expression of tight junction genes claudin(Cldn)-3, 5, zonula occludens (ZO)-1, 2 and Occludin(Occl) [12,13].

For the *in vitro* study of shear related effects on endothelial cells, most commonly parallel flow chambers or microfluidic systems have been used [10,11,14], capillary systems [7] or cone-and-plate systems [15–17]. While the capillary system closely resembles microvascular geometry which is important for barrier formation [6,18], only the cone-and-plate exerts a uniform wall shear stress (see [19,20] for a discussion of flow chamber shear stress distribution). Furthermore, no pressure-gradient is required to maintain the fluid flow.

Here, we describe and verify a cone-and-plate setup for the study of BBB properties of brain microvascular endothelial cells.

## Materials and Methods

### Cone-and-plate flow bioreactor

For the application of shear stress, a modified plate-and-cone bioreactor was used (see [16] for technical description). Briefly, a rotating cone lowered into a cell culture dish generates a circular fluid flow with a constant shear rate. This causes a uniform wall shear stress in circular direction at the dish bottom. This way, physiological shear could be applied on cell culture cells. The bioreactor contains six independent chambers so that six different experimental conditions could be applied at the same time. In all experiments, dishes with static cones were used as control.

Shear stress  $\tau$  was calculated by [21]:

$$\tau = \frac{\eta \cdot \omega \cdot r}{h_0 + r \cdot \tan \alpha} \quad (\text{Eq. 1})$$

with  $\eta$  being dynamic viscosity,  $\omega$  angular velocity,  $r$  radius,  $h_0$  distance between cone tip and plate and  $\alpha$  cone angle.

During experiments, angular velocities of 17.44 and 34.90  $\text{s}^{-1}$  were used for the application of 13 and 26  $\text{dyn/cm}^2$  (or 1.3 and 2.6 Pa, resp.), determined by cell culture medium viscosity  $\eta = 3.06 \text{ mPas}$ ,  $r = 9.5 \text{ mm}$ ,  $h_0 = 35 \text{ }\mu\text{m}$  and  $\alpha = 2.4^\circ$ .

The bioreactor has been designed for the use of either 6-Well-Plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) or six individual 35 mm cell culture dishes ( $\mu$ -Dish, Ibidi, Martinsried, Germany).



### **Flow validation**

For the validation of the system, tangential fluid velocities were measured. In every position of a cone-and-plate system, velocity should increase linearly with height. Fluid flow was analyzed by tracking fluorescent particles in suspension, comparable to the Particle Image Velocity technique [22]. In laser scanning microscope images, particles in motion draw a dotted trace. From the known scanning speed, horizontal velocity of the particles can be calculated [23,24]. Velocities were related to cone radius and height from plate. In addition, near ground flow visualization and secondary flow quantification was conducted with the use of bromphenol blue dye (see [16] for method).

### **Cell culture**

RBE-4 cells were cultivated in Ham's F12/MEM (1:1) with 1 ng/ml bFGF, 10 % fetal calf serum, 100 U/ml penicilin, 0.1 mg/ml streptomycin at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>.

For shear experiments, cells were cultured either in petri dishes ( $\mu$ -Dish 35 mm),  $1 \cdot 10^5$  cells per dish, or in six-well transwell inserts (0.4  $\mu$ m pore size,  $1.6 \cdot 10^6$  pores/cm<sup>2</sup>, BD Falcon, Heidelberg, Germany),  $5 \cdot 10^5$  cells per insert. Transwell inserts were coated with collagen I (Sigma-Aldrich, Taufenkirchen, Germany). Cells in petri dishes were allowed to form a tight monolayer for 4 days and cells in transwells were cultivated until they formed a stable transepithelial resistance after 7-8 days. Directly before shear experiments, cell culture medium was replaced with increased viscosity medium DMEM containing 5 % dextran 500,000 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 10 % fetal calf serum and 100 U/ml penicilin, 0.1 mg/ml streptomycin. Prior to usage, dextran was dialyzed with distilled water and freeze-dried (Lyophilizer AdVantage 2.0, SP Scientific, Suffolk, Britain). This

prevented negative effects on cell proliferation of the non-dialyzed dextran. Viscosity of the dextran medium was measured using a MCR 502 plate-plate rheometer (Anton Paar, Graz, Austria) in the range of 50 to 5000 s<sup>-1</sup>.

In petri dishes, medium volume was 2 ml and in transwell inserts, 2 ml in basolateral plus 2 ml in apical compartments.

### **Preparation of transwell inserts**

We noticed that after a few hours, small amounts of cell debris accumulated in the plate center under the cone tip, sedimented and grinded away adherent cells. This was caused by a slow inward flow and resulted in some experiments in a hole of varying diameter in the cellular monolayer. In addition, the wall shear rate equation (Eq. 1) is not true for the exact center. On that account, we chose to cover the center of the 6-well inserts with a self-adhesive foil (Hydrofilm, Hartmann, Wiener Neudorf, Austria). The foil had good optical properties and prevented diffusion and electrical conductance. It was attached to the bottom face of the transwell membrane before cell seeding, and thus did not disturb cellular growth or flow conditions.

### **Image analysis**

For the quantification of cell alignment to flow direction, cellular actin fibers were stained using 20 nM Phalloidin-Atto488 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Confocal laser scanning microscopic images were acquired at the radius of 5 mm with direction of flow set horizontal. Images were analyzed with a custom-designed script based on the open source software GNU Octave. For edge detection and noise suppression,

Scharr operators were employed [25], assigning each pixel a value for edge angle and intensity. All values above a threshold value were summarized in a histogram and statistically interpreted. A minimum of six images of every petri dish was analyzed, values were averaged. Mean and SEM were calculated from independent experiments.

The script is licensed under the GPL and can be obtained free of charge from the authors (contact [glasmacher@imp.uni-hannover.de](mailto:glasmacher@imp.uni-hannover.de)).

### **Trans-epithelial electrical resistance (TEER) and dye permeability**

Barrier properties were measured using TEER and Na-fluorescein (Na-F) permeability. Due to the comparably large membrane size of six-well inserts and the resulting low resistance readings, variations in TEER measurements (Evom-2, WPI, Berlin, Germany) had to be minimized. Each value was measured at least in duplicate and was averaged, using a chamber containing 40 ml of bath solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, 10 mM Glucose, pH 7.4, 298 mosmol/kg). STX2-electrodes (WPI) were fixed in a stand, and TEER reading after 15 s of measuring were noted. After TEER measurements, dye permeation was measured using 2 ml of 10 ng/ml Na-fluorescein (Na-F) in bath solution (Sigma-Aldrich, Taufenkirchen, Germany) in apical and 1 ml of bath solution in basolateral compartment. After 25 min of slow shaking incubation at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, Na-F concentration was measured with a microplate reader at 485 nm excitation (Mithras LB 940, Berthold, Bad Wildbach, Germany). Apparent permeability coefficient  $P_{app}$  was calculated by [26]:

$$P_{app} (cm/s) = \frac{V_B \Delta C_B}{AC_{A0} \Delta t}$$

with  $V_B$  basolateral volume,  $\Delta C_B/\Delta t$  change of concentration over time,  $A$  membrane area,  $C_{A0}$  initial apical concentration.

Change in  $P_{app}$  and TEER levels after treatment were compared to control using Student's t-test.

### **RNA-Expression**

After 24 h shear experiments in  $\mu$ -Dish petri dishes, cells were rinsed with PBS and total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). In each case, cells from two petri dishes were pooled due to small growth area (3.5 cm<sup>2</sup> per plate). Removal of potential genomic DNA contamination and cDNA synthesis was performed using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase (Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) according to the manufacturer's instructions. 9  $\mu$ l of total RNA were used per sample. Digestion of genomic DNA was performed for 30 min at 37 °C with dsDNase. The enzyme mix for reverse transcription was added and the reverse transcription reaction carried out with the following temperature profile: 10 min at 25 °C, 30 min at 65 °C and 5 min at 85 °C. The cDNA was diluted to a final concentration of 12.5 ng/ $\mu$ l. 1  $\mu$ l of each sample was removed after DNA digestion but before cDNA synthesis and used as a template in a PCR reaction to confirm complete removal of DNA. 62.5 ng of the first strand cDNA was used as template for a PCR reaction with a final volume of 20  $\mu$ l containing 0.2  $\mu$ M of each primer and 1 x GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, Mannheim, Germany). Amplification was carried out using the following temperature profile: 95 °C for 3 min followed by cycles of 95 °C for 15 s, 59 °C for 30 s and 72 °C for 45 s with a final step at 72 °C for 5 min. In order to determine mRNA quantity, for each

gene a cycle number was used within the range of the exponential amplification as determined by a titration curve [27] and gapdh was used as housekeeping gene. Integrated densities of the gel bands were analyzed using ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Band intensities were normalized to the intensity of the corresponding gapdh band and intensity ratios of cells exposed to shear stress were related to untreated cells. Expression of eleven tight junctions proteins was detected (Table 1), results were compared using one-way ANOVA.

### **Immunofluorescence**

Transwell inserts were stained with anti-claudin3 antibody (Bioss, Woburn , MA, USA). Cells grown in transwell inserts were washed with PBS and fixed in 4 % formaldehyde in PBS for 20 min at 4 °C. Cells were blocked with 0.5 % bovine serum albumine in PBS for 30 min at 37 °C and washed afterwards with PBS. The transwell membranes were subsequently cut in two; one half of the membrane was incubated with primary rabbit anti-claudin3 antibody, diluted 1:100 in 0.3 % triton X-100 in PBS over night at 4 °C. The other half was incubated without primary antibody as a negative control. After washing the cells three times with PBS, actin filaments were stained with 20 nM Phalloidin-Atto550 (Sigma-Aldrich). The secondary goat anti-rabbit-AlexaFluor488 antibody was diluted 1:1000 in 0.3 % triton X-100 in PBS together with 2 µM DAPI (Sigma-Aldrich) for staining of cell nuclei and incubated with the cells for 1 h at 37 °C. Four randomly selected images were obtained from each membrane using a 60 x water immersion objective.

## Results

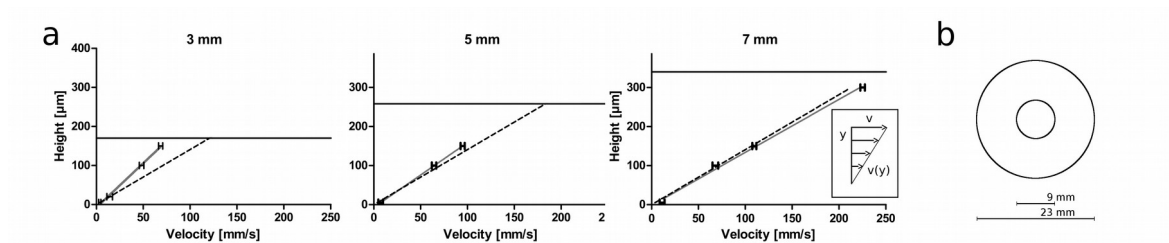
### Bioreactor validation

The bioreactor showed a laminar, circular flow with a slight inward spiraling movement close to the dish bottom. This is caused by centrifugal forces close to the cone surface and has been described before [16,28,29]. This secondary flow was analyzed using bromphenol blue dye tracking and could be determined to change flow direction by less than  $3.5^\circ$  from circular path (data not shown), increasing shear magnitude less than 0.2 % of values calculated by Eq. 1.

Analysis of particle velocity at different locations in the cone gap was used to validate the flow profile (Figure 1a). At radii of 3, 5 and 7 mm, linear velocity gradients from bottom to top were found, being typical of a laminar Couette flow. Together with the known dynamic viscosity, fluid shear stress can be derived from this slope. At the radius of 3 mm, the slope was higher than expected (calculated values are shown as dashed lines). This led to a higher wall shear stress and a non-uniform treatment of cells in the plate center. This may be caused by production imperfections at the cone tip. However, cells from this center region were excluded from subsequent measurements by the self-adhesive foil on the bottom face of the transwell membrane (Figure 1b). This foil did not interfere with cellular growth or fluid dynamics.

After 24 h of flow, RBE cells displayed an elongated, flattened morphology. The distribution of actin fiber orientation could be determined by automated software analysis. Actin filaments as an indicator of endothelial alignment to mechanical stimuli have been used as early as 1989 [30]. A clear, dose-dependent alignment to the direction of flow was

visible and could be quantified using the Octave script (Figure 2). The histogram peak angle corresponded to the inward spiral that was quantified in flow experiments.

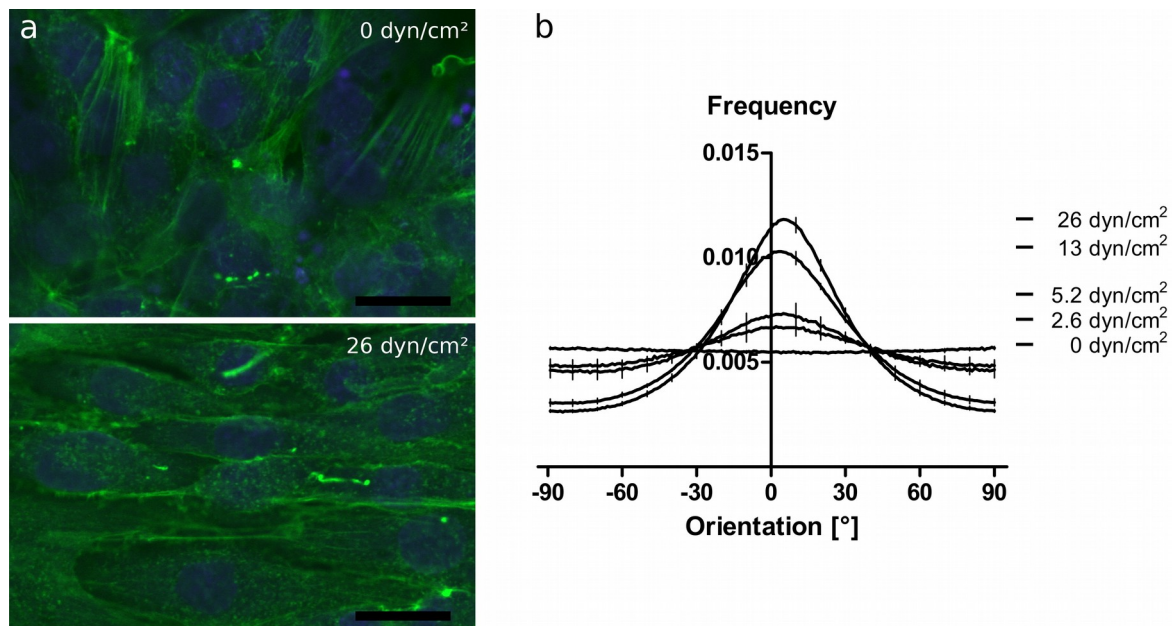


**Figure 1.** Fluid flow in the cone-and-plate system at  $\omega = 34.9 \text{ s}^{-1}$ . (a) Vertical velocity profiles at the radii 3, 5 and 7 mm as measured by particle tracking. The cone gap height, indicated by a horizontal line, increases with radius. In all cases, measured velocity increased linearly, demonstrating the laminar Couette flow (shown in the right-hand box). Calculated shear rates are shown as dashed lines. At a radius of 3 mm, the shear rate (the slope of the velocity) was higher than expected. Values are shown as mean  $\pm$  SEM,  $n = 5-8$ , with gray line indicating linear regression.

(b) Schematic top view of the transwell insert membrane. The center part smaller radius of 4.5 mm ( $\cong$  9 mm diameter) is covered by self-adhesive Hydrofilm on the bottom face. This prevented dye diffusion and electrogen ion flux at this area, excluding these cells from subsequent measurements. In this way, membrane area was reduced by 15.5 %.

### Measurement of barrier properties

TEER and apparent permeability were measured in transwell inserts before and after the application of 26 dyn/cm<sup>2</sup> for 24 h and compared to static control. With both methods, no increase of barrier properties through application of fluid flow was observed (Table 2). Student's t-test revealed no significant differences between treated and control cells. In previous experiments, comparable results were obtained with the human brain microvascular cell line hCMEC/D3 (data not shown).



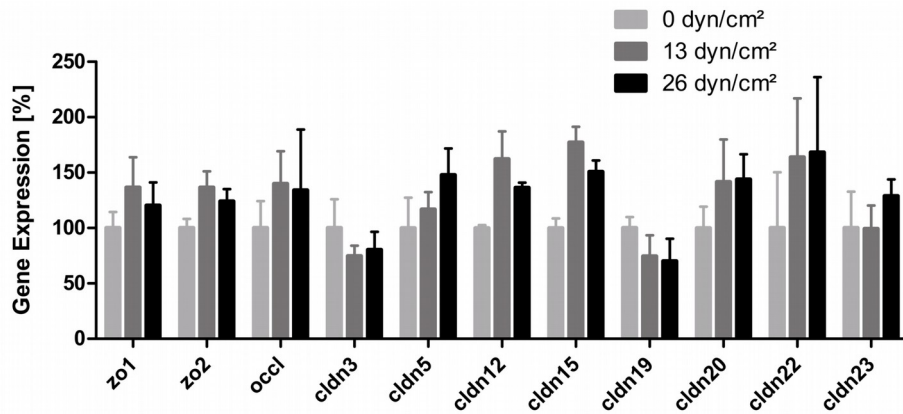
**Figure 2.** RBE alignment to fluid flow. (a) Actin fibers and nuclei were stained with Phalloidin (green) and Hoechst (blue). Cells were notably elongated and aligned to horizontal shear direction. Phalloidin images were analyzed by a custom GNU Octave script. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

(b) Histogram of cellular orientation after 24 h flow conditions of 26, 13, 5.2, 2.6 and 0  $\text{dyn/cm}^2$  (from top to bottom peak). Shear forces led to cellular alignment in a dose dependent manner. The peak orientation of the cells is slightly shifted from circular path due to small inward spiraling secondary flow. Vertical lines depict SEM,  $n = 6$  (0, 13, 26  $\text{dyn/cm}^2$ ) or  $n = 2$  (2.6, 5.2  $\text{dyn/cm}^2$ ).

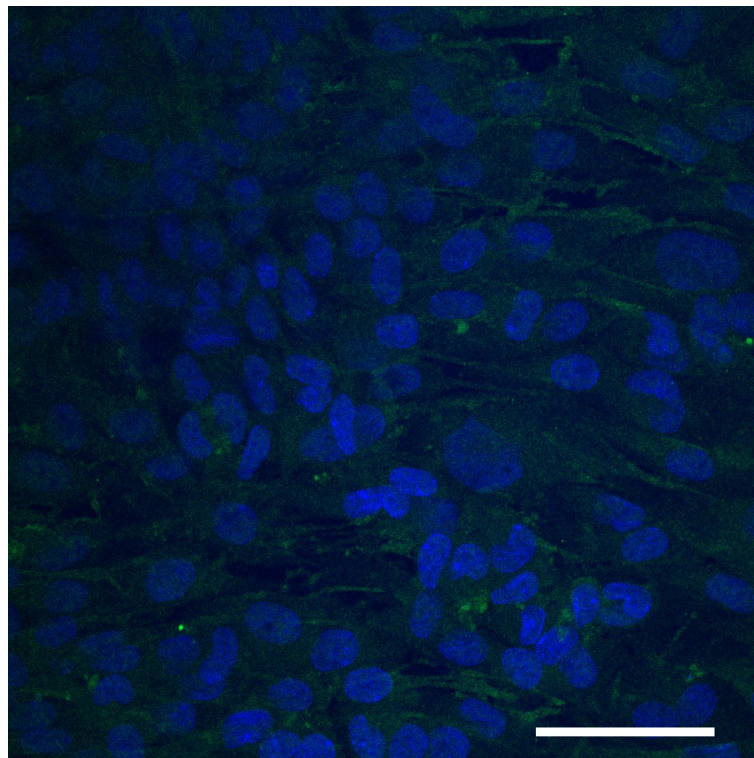
### Tight junction protein expression and localization

Expression of eleven tight junction proteins was analyzed in RBE cells exposed to 24 h of 0, 13 and 26  $\text{dyn/cm}^2$  shear stress (Figure 3). In no case, a significant change in RNA level after exposition to flow was detected. To monitor cellular claudin-3 localization, immunofluorescence stains of the transwell membrane were conducted (Figure 4). A basal claudin signal and no distinct localization at cell-cell contact sites could be observed.





**Figure 3.** RNA expression of tight junction proteins after 24 h of 13 or 26 dyn/cm<sup>2</sup> shear stress vs. control.



**Figure 4.** Claudin-3 immunostaining. Scale bar: 50  $\mu$ m.

## Discussion

Here, we describe the application of well-defined shear stress on brain microvascular endothelial cells. The cone-and-plate bioreactor exerted a linear Couette flow that could be quantified using laser scanning microscope particle image velocimetry. For the commonly used, pressure gradient driven flow chambers, non-uniform flow behavior across the monitored cell seeding area has been reported [19], as well as inhomogeneous and non-comparable shear assumptions in different commercial flow chambers [20]. Flow profiles in the plate-and-cone bioreactor were linear and magnitudes as predicted. This was not true for the plate center: At low radii, the shear equation (Eq. 1) comes to a limit. Flow profiles showed increased shear rates and cells detached from the central portion of the plate. We excluded this region from TEER and  $P_{app}$  analyses by placing an impermeable foil on the bottom membrane face.

To the author's knowledge, the presented bioreactor is the first cone-and-plate system that allows the application of shear stress on transwell inserts, the established model system for static BBB models [7]. However, cells on porous membranes have before been subjected to shear in form of capillaries [13], integrated into a microfluidic chip [10,11] or in transwell inserts using orbital shakers [31,32].

Rat brain endothelial cells RBE-4 in this flow field aligned to shear in a dose-dependent manner and the cellular monolayer stayed intact. This shows that the reactor functioned as intended and the cells showed a physiological response. Here the question arose, whether this treatment enhances barrier properties as reported in multiple cases [10,13,32–34]. In clear disagreement to literature data, our results showed that TEER and  $P_{app}$  were not influenced by 24 hour treatment with shear stress. Similar findings were also observed

using human hCMEC/D3 cells. Expression analysis as well as immunofluorescence showed that tight junction expression or protein localization was not altered after shear treatment.

A treatment time of 24 hours is comparable to most of the above mentioned publications, except from the group of Cucullo and Janigro who developed and used the “div-BBB” system [13]. They applied dynamic conditions for several weeks in a hollow fiber capillary membrane system and reported a drastic increase in barrier properties. In the cone-and-plate bioreactor, experiments of such time periods are challenging due to low parallel experiment number and the necessity to maintain sterility. Our aim was to separate the impact of curvature and geometry of cultivation, that affects BBB differentiation [6] and shear stress using a two-dimensional endothelial monolayer.

Moreover, there is evidence that a distinct morphological adaption to shear as observed in this work is not typical of endothelial cells of the BBB. The group of Searson reported that brain microvascular endothelial cells HBMEC do not align to shear. They suggested that a non-elongated shape is a strategy of minimizing cell-cell junction length and improving barrier function [18,35]. Alignment as a response to shear could be sign of hCMEC/D3 and RBE4 cells dedifferentiation.

We were not able to reproduce an increase of BBB barrier properties in cerebral endothelial cells after shear stress treatment. However, both reasons, treatment time and cell-line characteristics could be the explanation for disagreement with published data.

**Acknowledgement:** We would like to thank Anne Klett, Kristina Schmitt, Moritz von Wrangel and Jan Hildebrandt for technical and experimental support.

## References

- [1] W.M. Pardridge, The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development, *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 2 (2005) 3–14. doi:10.1602/neurorx.2.1.3.
- [2] N.J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson, Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier, *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (2006) 41–53. doi:10.1038/nrn1824.
- [3] I. Wilhelm, C. Fazakas, I.A. Krizbai, In vitro models of the blood-brain barrier, *Acta Neurobiol Exp Wars.* 71 (2011) 113–28.
- [4] W. Löscher, H. Potschka, Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family, *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 2 (2005) 86–98. doi:10.1602/neurorx.2.1.86.
- [5] B.T. Hawkins, T.P. Davis, The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 173–185. doi:10.1124/pr.57.2.4.
- [6] A.D. Wong, M. Ye, A.F. Levy, J.D. Rothstein, D.E. Bergles, P.C. Searson, The blood-brain barrier: an engineering perspective, *Front. Neuroengineering.* 6 (2013) 7. doi:10.3389/fneng.2013.00007.
- [7] P. Naik, L. Cucullo, In vitro blood-brain barrier models: Current and perspective technologies, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 1337–1354. doi:10.1002/jps.23022.
- [8] L. Cucullo, P.-O. Couraud, B. Weksler, I.-A. Romero, M. Hossain, E. Rapp, et al., Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28 (2008) 312–328.

[9] S. Santaguida, D. Janigro, M. Hossain, E. Oby, E. Rapp, L. Cucullo, Side by side comparison between dynamic versus static models of blood-brain barrier in vitro: a permeability study, *Brain Res.* 1109 (2006) 1–13. doi:10.1016/j.brainres.2006.06.027.

[10] R. Booth, S. Noh, H. Kim, A multiple-channel, multiple-assay platform for characterization of full-range shear stress effects on vascular endothelial cells, *Lab. Chip.* 14 (2014) 1880. doi:10.1039/c3lc51304a.

[11] L.M. Griep, F. Wolbers, B. de Wagenaar, P.M. ter Braak, B.B. Weksler, I.A. Romero, et al., BBB ON CHIP: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function, *Biomed. Microdevices.* 15 (2013) 145–150. doi:10.1007/s10544-012-9699-7.

[12] O.C. Colgan, G. Ferguson, N.T. Collins, R.P. Murphy, G. Meade, P.A. Cahill, et al., Regulation of bovine brain microvascular endothelial tight junction assembly and barrier function by laminar shear stress, *AJP Heart Circ. Physiol.* 292 (2007) H3190–H3197. doi:10.1152/ajpheart.01177.2006.

[13] L. Cucullo, M. Hossain, V. Puvenna, N. Marchi, D. Janigro, The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology, *BMC Neurosci.* 12 (2011) 40.

[14] E.J. Anderson, M.L. Knothe Tate, Open access to novel dual flow chamber technology for in vitro cell mechanotransduction, toxicity and pharmacokinetic studies, *Biomed. Eng. OnLine.* 6 (2007) 46. doi:10.1186/1475-925X-6-46.

[15] C. Spruell, A.B. Baker, Analysis of a high-throughput cone-and-plate apparatus for the application of defined spatiotemporal flow to cultured cells, *Biotechnol. Bioeng.* 110 (2013) 1782–1793. doi:10.1002/bit.24823.

[16] L. Dreyer, B. Krolitzki, R. Autschbach, P. Vogt, T. Welte, A. Ngezahayo, et al., An advanced cone-and-plate reactor for the in vitro-application of shear stress on adherent cells, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 49 (2011) 391–397. doi:10.3233/CH-2011-1488.

[17] M.H. Buschmann, P. Dieterich, N.A. Adams, H.-J. Schnittler, Analysis of flow in a cone-and-plate apparatus with respect to spatial and temporal effects on endothelial cells, *Biotechnol. Bioeng.* 89 (2005) 493–502. doi:10.1002/bit.20165.

[18] M. Ye, H.M. Sanchez, M. Hultz, Z. Yang, M. Bogorad, A.D. Wong, et al., Brain microvascular endothelial cells resist elongation due to curvature and shear stress, *Sci. Rep.* 4 (2014) 4681. doi:10.1038/srep04681.

[19] J.A. McCann, S.D. Peterson, M.W. Plesniak, T.J. Webster, K.M. Haberstroh, Non-Uniform Flow Behavior in a Parallel Plate Flow Chamber Alters Endothelial Cell Responses, *Ann. Biomed. Eng.* 33 (2005) 328–336. doi:10.1007/s10439-005-1735-9.

[20] E.J. Anderson, T.D. Falls, A.M. Sorkin, M.L. Tate, The imperative for controlled mechanical stresses in unraveling cellular mechanisms of mechanotransduction, *Biomed. Eng. Online.* 5 (2006) 27.

[21] A. Ponche, D. Dupuis, On instabilities and migration phenomena in cone and plate geometry, *J. Non-Newton. Fluid Mech.* 127 (2005) 123–129. doi:10.1016/j.jnnfm.2005.02.007.

[22] R.J. Adrian, Twenty years of particle image velocimetry, *Exp. Fluids.* 39 (2005) 159–169. doi:10.1007/s00348-005-0991-7.

[23] T.N. Kim, P.W. Goodwill, Y. Chen, S.M. Conolly, C.B. Schaffer, D. Liepmann, et al., Line-Scanning Particle Image Velocimetry: An Optical Approach for Quantifying a

Wide Range of Blood Flow Speeds in Live Animals, PLoS ONE. 7 (2012) e38590. doi:10.1371/journal.pone.0038590.

[24] S.M. Choi, W.H. Kim, D. Côté, C.-W. Park, H. Lee, Blood cell assisted in vivo Particle Image Velocimetry using the confocal laser scanning microscope, Opt. Express. 19 (2011) 4357. doi:10.1364/OE.19.004357.

[25] J. Weickert, H. Schar, A Scheme for Coherence-Enhancing Diffusion Filtering with Optimized Rotation Invariance, J. Vis. Commun. Image Represent. 13 (2002) 103–118. doi:10.1006/jvci.2001.0495.

[26] D.E. Eigenmann, G. Xue, K.S. Kim, A.V. Moses, M. Hamburger, M. Oufir, Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies, Fluids Barriers CNS. 10 (2013) 33. doi:10.1186/2045-8118-10-33.

[27] J.E. Trosko, C.-C. Chang, M.R. Wilson, B. Upham, T. Hayashi, M. Wade, Gap Junctions and the Regulation of Cellular Functions of Stem Cells during Development and Differentiation, Methods. 20 (2000) 245–264. doi:10.1006/meth.1999.0941.

[28] H.-J. Schnittler, R.P. Franke, U. Akbay, C. Mrowietz, D. Drenckhahn, Improved in vitro rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells, Am. J. Physiol.-Cell Physiol. 265 (1993) C289–C298.

[29] M.E. Fewell, J.D. Hellums, The Secondary Flow of Newtonian Fluids in Cone-and-Plate Viscometers, Trans. Soc. Rheol. 1957-1977. 21 (1977) 535–565.

[30] P.C. Dartsch, E. Betz, Response of cultured endothelial cells to mechanical stimulation, Basic Res Cardiol. 84 (1989) 268–281.

[31] C.M. Warboys, R. Eric Berson, G.E. Mann, J.D. Pearson, P.D. Weinberg, Acute and chronic exposure to shear stress have opposite effects on endothelial permeability to macromolecules, *AJP Heart Circ. Physiol.* 298 (2010) H1850–H1856. doi:10.1152/ajpheart.00114.2010.

[32] T.G. Walsh, R.P. Murphy, P. Fitzpatrick, K.D. Rochfort, A.F. Guinan, A. Murphy, et al., Stabilization of brain microvascular endothelial barrier function by shear stress involves VE-cadherin signaling leading to modulation of pTyr-occludin levels, *J. Cell. Physiol.* 226 (2011) 3053–3063. doi:10.1002/jcp.22655.

[33] V. Siddharthan, Y.V. Kim, S. Liu, K.S. Kim, Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells, *Brain Res.* 1147 (2007) 39–50. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.029.

[34] B. Prabhakarandian, M.-C. Shen, J.B. Nichols, I.R. Mills, M. Sidoryk-Wegrzynowicz, M. Aschner, et al., SyM-BBB: a microfluidic blood brain barrier model, *Lab. Chip.* 13 (2013) 1093. doi:10.1039/c2lc41208j.

[35] A. Reinitz, J. DeStefano, M. Ye, A.D. Wong, P.C. Searson, Human brain microvascular endothelial cells resist elongation due to shear stress, *Microvasc. Res.* 99 (2015) 8–18. doi:10.1016/j.mvr.2015.02.008.



## Tables

**Table 1.** Rat specific primers used for expression analysis.

<b>Gene</b>	<b>Sequence (forward and reverse)</b>	<b>Length (bp)</b>	<b>Cycles</b>
<b>gapdh</b>	CCGCATCTTCTTGTGCAGTGCCA GCGGGATCTCGCTCCTGGAAGAT	284	19
<b>zo-1</b>	TCGCCGCATTGTAGAGTCAG ATAATGCCCGAGCTCCGATG	564	29
<b>zo-2</b>	TAGACACGCTGTACGATGGC CAGATCCCGCATCTTTGGGT	402	28
<b>occl</b>	TGCTTCATCGCTTCCTTGGT TGCCATTCACCTTGCCGTTG	559	42
<b>cldn3</b>	TACCGATCGGACTGGACGG CCGATGAATGCCGAAACGC	453	41
<b>cldn5</b>	GTACTCAGCACCAAGGCGAA TGCCCTTTCAGGTTAGCAGG	448	41
<b>cldn12</b>	CGAAACACACTGCCCAAGC AAAACAGGAGTCCAGCCACC	449	34
<b>cldn19</b>	CCATTGTCCAGAACTCGTGC ACGCCTCCGTGTCTCTCTAA	472	41
<b>cldn20</b>	TGACCACGCACCACATTACC GAGATCCCTGCGGTGATGAA	452	41
<b>cldn22</b>	CTCTCTGCTGGGATGGGTTTT TGCTGGTGGTCTCCTAGTCC	579	43
<b>cldn23</b>	GGTGTGAAGAGCGTTGTTGC CCTCCAGTTAGAGGAAGGCG	442	39

**Table 2:** Transepithelial electrical resistance (TEER) and apparent permeability for Na-F.

	0 dyn/cm <sup>2</sup>		26 dyn/cm <sup>2</sup>		n
	pre	post	pre	post	
<b>TEER (<math>\Omega \cdot \text{cm}^2</math>)</b>	17.85 ± 1.98	18.26 ± 1.60	21.27 ± 3.44	23.64 ± 3.47	16-20
<b>P<sub>app</sub> (10<sup>-6</sup> cm/s)</b>	5.42 ± 1.07	4.84 ± 1.14	5.73 ± 1.42	3.64 ± 0.31	14-17

Transwells after 7-8 days of static cell culture were placed in the plate-and-cone system with static (0 dyn/cm<sup>2</sup>) or rotating (26 dyn/cm<sup>2</sup>) cones. Changes between pre and post treatment were compared using Student's t-test, revealing no significant differences.

## **Improved hemocompatibility of electrospun vascular graft by endothelial pre-seeding**

Short title: Graft Hemocompatibility

Lutz Dreyer<sup>1,2</sup>, Marc Müller<sup>1</sup>, Benjamin Krolitzki<sup>1</sup>, Holger Zernetsch<sup>1</sup>, Dagmar Pfeiffer<sup>3</sup>,  
Anaclet Ngezahayo<sup>2</sup>, Birgit Glasmacher<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Multiphase Processes, and <sup>2</sup> Institute for Biophysics, Leibniz Universität Hannover, Germany

<sup>3</sup> Institute for Cell Biology, Histology and Embryology, Medical University Graz, Austria

Address for correspondence: Lutz Dreyer, Institute for Multiphase Processes, Callinstr. 36, 30167 Hannover, Germany.

Phone: +49 511 762 19356, fax: +49 511 762 3031,

e-mail: dreyer@imp.uni-hannover.de.

The Authors state that this manuscript has not been published previously and is not currently being assessed for publication by any journal other than the International Journal of Artificial Organs. Each Author has contributed substantially to the research, preparation and production of the paper and approves of its submission to the Journal.

## Abstract

**Purpose:** Current small caliber artificial grafts suffer from frequent occlusion and infection. On this account, they are in the majority of cases avoided in favor of biological grafts. The approach of tissue engineering aims to improve artificial grafts with the use of degradable scaffolds that allow cellular ingrowth and host tissue regeneration. We manufactured and tested a three-layered vascular graft with a stable core layer and hydrophilic outer layers for cellular attachment and growth.

**Methods:** The electrospinning technique was used to produce a highly porous and stable graft composed of the biodegradable polymers polycaprolactone (PCL) and polylactic acid (PLA). The effect of subsequent gamma sterilization on mechanical properties was investigated. Grafts were seeded with primary rat aorta endothelial cells using a small-scale bioreactor. A rotating device allowed uniform cell attachment at the inner graft surface. After 10 days of culture time, *in vitro* hemocompatibility of the grafts was evaluated using a Chandler Loop system. Hemolysis, coagulation time and platelet loss were compared for non-seeded vs. endothelialized grafts.

**Results:** Sterilization had no significant impact on mechanical properties. Endothelialization was successful and strikingly improved blood compatibility: Platelet loss was almost eliminated in Chandler Loop experiments.

**Conclusions:** We show that endothelialization highly improves hemocompatibility of vascular grafts. As spontaneous *in vivo* endothelialization is very slow and thrombus formation occurred in some animal model experiments, we propose the pre-seeding as a key to successful vascular graft tissue engineering.

**Key words:** hemocompatibility, polycaprolactone, polylactic acid, electrospinning, cardiovascular graft, rat aorta

## Introduction

Cardiovascular diseases are a major problem in western civilization. In the event of vascular injury, aneurysm or stenosis, replacement surgery is needed. As compared to biological grafts, major advantages of synthetic grafts are the high availability of different length and diameter conduits and the avoidance of secondary surgery for autotransplantation. In clinic routine, the polymeric materials polyethylene terephthalate (PET, Dacron) and expanded Polytetrafluoroethylene (ePTFE) are well approved. In grafts with a diameter  $>6$  mm, hydrophobic surfaces prevent cellular attachment and intima formation while exhibiting a low thrombogenicity. However, artificial grafts of smaller diameters still suffer from frequent occlusion (1,2). As opposed to the cell repellent surfaces of currently used polymers, the approach of tissue engineering materials is the promotion of specific cellular growth: A continuous coverage of a foreign material with an endothelial monolayer circumvents material-blood contact. Ingrowth of cells and vascularization of the scaffold material as well as a tight integration into the surrounding connective tissue supports host immune system. This avoids graft infection, which is a further shortcoming of artificial implants (1). Finally, an ideal tissue engineering material degrades over time, allowing complete native tissue recovery.

In recent research, electrospinning has been used as a way to produce highly porous but still robust polymeric bulk material (see (3,4) for detailed reviews). Degradable polymers

such as polycaprolactone (PCL), polylactic acid (PLA) and many others are biocompatible and give high mechanical strength suitable for vascular surgery (5).

*In vivo* experiments with electrospun tubes have been conducted in rat (6), dog (7), rabbit (8) or sheep (9). In bare PCL tubes with a length of 10 mm, endothelialization has been reported to occur in the time scale of weeks to months, starting from contact sites to native vessels (10,11). An endothelial cell layer effectively prevents platelet activation and graft occlusion by thrombosis. However, in some *in vivo* studies, the occurrence of thromboses has been reported in electrospun vascular grafts before or during endothelialization. To date, long term trials are still rare but reveal additional problems concerning graft calcification, intimal hyperplasia and missing smooth muscle cell infiltration (10). For these reasons, there is a high demand for improving degradable artificial grafts.

Here, we investigate an electrospun three-layered vascular graft. The vessel wall is composed of a pure PCL core, enclosed within two PCL/PLA blend layers that are designed for cellular attachment and a faster degradation. Rat primary endothelial cell seeding was conducted with a standardized protocol using a small-scale bioreactor and a rotating device. The endothelialized grafts were evaluated by dynamic *in vitro* hemocompatibility testing and by microscopic investigation after the experiments.

## **Materials and Methods**

### **Multi layer graft fabrication**

The inner and outer wall layer were spun from a blend of PCL (100 mg/ml) and PLA (50 mg/ml). Both layers were separated by a layer spun from pure PCL (130 mg/ml). Polymers were dissolved in 2,2,2-trifluoroethanol (all Sigma, Taufenkirchen, Germany) on a stirrer for at least 24 h.

The electrospinning process was performed with a custom-made setup, consisting of a high voltage supply, a polymer reservoir with a 0.88 mm hollow needle as nozzle and a grounded collector. A mandrel of stainless steel with a diameter of 4 mm, rotating at 1000 rpm, was used as a collector. The applied voltage was set to 20 kV and the distance between nozzle and collector was 28.5 cm. Each layer was spun for 3 minutes at a flow rate of 3 ml/h. Grafts were sterilized by gamma irradiation of 25 kGy (BBF sterilization, Kernen-Rommelshausen, Germany). To assess changes in material properties induced by the sterilization process, mechanical tests were conducted with sterilized and non-sterilized grafts.

Cytotoxicity of the graft material was evaluated following EN ISO 10993, testing for possible proliferation affecting agents eluted from the samples. Sterilized tubes were cut into small pieces and incubated in cell culture medium for 24 hrs. In such way conditioned medium was transferred on adherent NIH-3T3 mouse fibroblast cells and cell number was measured after 24 hrs. As control, untreated media (“null control”), non-toxic polyethylene samples (“negative control”) and 0.5 % sodium dodecyl sulfate (SDS) (“positive control”) were used. Cell number was measured by automated count of Hoechst (Sigma,

Taufenkirchen, Germany) stained nuclei,  $n = 5$ , 25 images per repeat. Results were compared to untreated media using a one-way Student's t-test.

### **Material Characterization**

For sterilized and non-sterilized grafts, fiber diameters of at least 2000 fibers were measured using scanning electron micrographs (VP-SEM S3400, Hitachi Europe, Krefeld, Germany, magnification 4000x) using the software AxioVision 4.7 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Static tensile testing was performed under ambient conditions at a velocity of 20 mm/min. Samples with a free gauge length of 20 mm were mounted with a custom-made clamp into tensile testing machine 5565A (Instron, Norwood, USA).

Wall thickness  $d$  was determined by SEM after cutting samples using a cryotome to achieve a straight cut surface. The cross-sectional area  $A$  for Young's modulus and ultimate tensile strength was then calculated with the known inner radius  $R_i$  of 4 mm:

$$A = \pi((R_i + d)^2 - R_i^2) \quad \text{Eq. 1}$$

Ultimate tensile strength, Young's modulus and strain at break were calculated using the software SciLab.

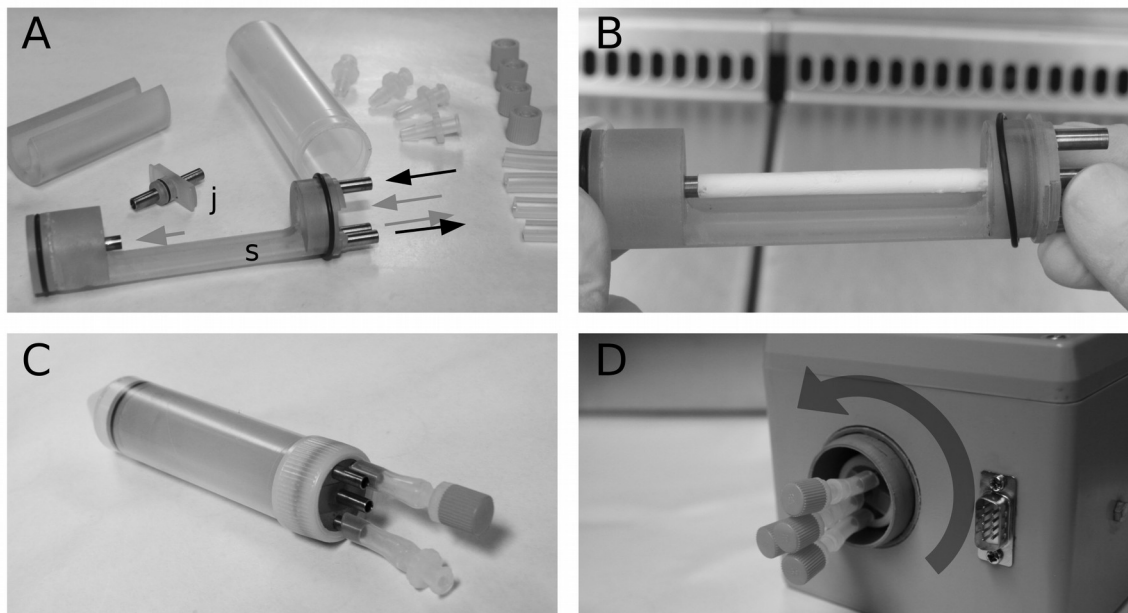
### **Cell seeding of the graft**

Primary rat aorta cells were isolated from adult Wistar rats. Briefly, after surrounding tissue was removed, dissected aortas were opened longitudinally and endothelial cells were carefully scraped off using a sterile scalpel. Primary cells were cultivated in DMEM with 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5105 U heparin (all Biochrom, Berlin, Germany) and 30  $\mu\text{g/ml}$  ECGS (Millipore, Temecula, USA) and used at passage 2. Before cell



seeding, grafts were coated with  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  fibronectin (Sigma, Taufenkirchen, Germany) and placed in a custom-made bioreactor.

The small-scale seeding reactor fits into a standard 30 ml centrifuge tube (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and allows inner and outer cell culture medium circulation (Fig. 1 A-C). The graft ends were gently stretched and mounted on two titanium connectors. After the outer system was filled with culture medium, 3 ml cell suspension were inserted into the inner circulation.  $2.5 \cdot 10^5$  cells/ml were used to achieve a seeding density of  $1.5 \cdot 10^4$  cells per  $\text{cm}^2$  inner graft surface. The reactor was placed inside a rotating apparatus for 1 hr (Fig. 1 D) at  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  atmosphere. Automatic axial rotation steps every three



*Fig. 1. (A) The cell seeding bioreactor contains inner (gray) and outer (black arrows) circulation. Backflow of media is allowed by two channels integrated in the reactor shaft (s). The separate joint (j) is used to mount the grafts inside. (B) For this purpose, graft ends are pulled over the titanium connectors. (C) The bioreactor fits inside a standard 30 ml centrifuge tube. Silicone tubes with Luer lock connectors are attached to the circulation systems, as shown here for the outer circulation. (D) After filling with cell suspension, the assembled bioreactor is rotated axially according to a programmed protocol by a rotating device inside a cell incubator.*

minutes with four different resting positions allowed the cells to adhere to the complete inner tube surface. After rotational seeding, grafts were cultured under static conditions for 10 days to allow confluent endothelial growth.

Non-seeded grafts served as control for hemocompatibility testing and were treated accordingly including fibronectin coating and cell culture medium incubation.

### **Dynamic *in vitro* hemocompatibility testing**

Hemocompatibility testing was carried out in a Chandler Loop system using fresh porcine blood obtained from eight different animals. The Chandler Loop principle utilizes gravity based blood flow within a rotating tube loop to avoid blood damage through pumping (12–14). Grafts of 45 mm length were connected to a silicone tube with inner diameter of 4 mm (Tygon ND-100-65, Saint-Gobain, Courbevoie, France) via two titanium connectors. Grafts were then sealed with a self-adhesive foil to avoid blood leakage. Non-seeded grafts and empty tubes served as control. Total loop length was 640 mm for all experiments. Every tube was filled with 3 ml citrated porcine blood and experiments continued for 1 hr, with a flow velocity of 200 mm/s and at a temperature of 37 °C.

Immediately after the experiments, hemolysis, platelet count and coagulation time were determined. Values were normalized to zero values which were determined before performing the experiments. This allowed a compensation of individual variation in the blood samples. The index of hemolysis as a standard parameter for determining the hemocompatibility of biomaterials is defined by:

$$IH = \frac{\left(1 - \frac{HCT}{100}\right) \cdot PHb}{THb} 100\% \quad \text{Eq. 2}$$

With IH: Index of hemolysis [%], HCT: Hematocrit, PHb: Plasma hemoglobin [g/dl], THb: Total hemoglobin [g/dl].

Concentrations of total and free hemoglobin were determined photometrically using the Hemoglobin FS kit (DiaSys, Holzheim, Germany). Platelets were counted manually in a Neubauer chamber after using TTV platelet single-test kit (Kabe, Nümbrecht-Elsenroth, Germany). The amount of residual platelets was normalized to zero values using the following formula:

$$PLT = \frac{PLT_{1h}}{PLT_{0h}} \cdot 100\% \quad \text{Eq. 3}$$

PLT = Platelet index [%],  $PLT_{1h}$  = Platelet count after one hr [1/ $\mu$ l],  $PLT_{0h}$  = Zero value [1/ $\mu$ l].

Coagulation time was measured using a Schnitger & Gross coagulometer (Med GV 3, Sycomed, Lemgo, Germany) by pipetting 20  $\mu$ l of blood into a reaction tube and incubating at 37 °C for 3 minutes. After incubation, 100  $\mu$ l of calcium chloride was added to the sample to reverse the citrate anticoagulation. The reaction tube was placed in the system and the measurement was started immediately. The recorded coagulation time was normalized to zero values using the following formula:

$$CT = \frac{CT_{1h}}{CT_{0h}} \cdot 100\% \quad \text{Eq. 4}$$

CT = Change in coagulation time [s],  $CT_{1h}$  = Coagulation time after one hour [s],  $CT_{0h}$  = Zero value [s]

### **Imaging**

After blood compatibility testing, samples were rinsed with PBS and fixed with 2.5 % glutaraldehyde, 2 % formaldehyde in PBS, then 1 %  $OsO_4$  in water and dried via

supercritical drying for SEM imaging. For fluorescence microscopy, samples were fixed in 4 % formaldehyde and stained with 10 mg/l Hoechst 33342, 20 nM Phalloidin-Atto-488 (all Sigma, Taufenkirchen, Germany) and 1:50 endothelial cell marker Anti-PECAM (Santa Cruz, Dallas, USA), followed by anti-rabbit secondary antibody coupled to Alexa Fluor 647 (Cell Signaling, Frankfurt, Germany).

### **Statistics**

Results were compared using Student's t-test or ANOVA with Dunnett's test. Mean values are given  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## **Results**

### **Material Testing**

Artificial grafts with a length of 45 mm and an inner diameter of 4 mm were produced by electrospinning. A fiber diameter of  $0.92 \pm 0.008 \mu\text{m}$  was measured for the untreated samples whereas the gamma sterilized grafts had a fiber diameter of  $1.00 \pm 0.007 \mu\text{m}$ . The three different layers could not be distinguished morphologically in cross sections, indicating a firm adhesion between the layers without any delamination (Fig. 2 A, B).

Cytotoxicity testing revealed that the material did not toxically affect the cells. After cultivation for 24 hrs, a cell density of  $167.6 \text{ cells/mm}^2$  and  $151.6 \text{ cells/mm}^2$  was found for cells cultivated under negative control conditions and material conditioned media (Fig. 2 C).

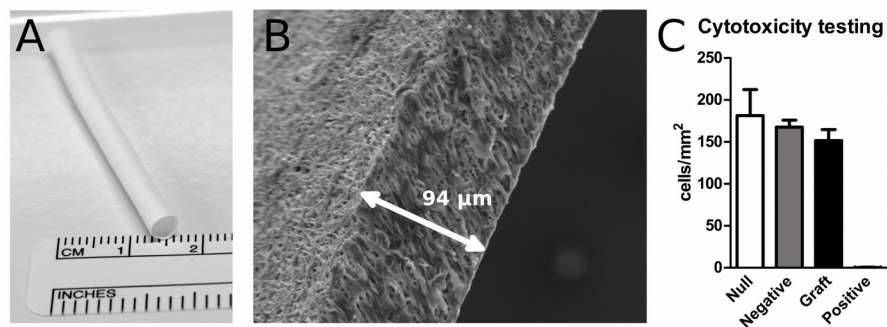
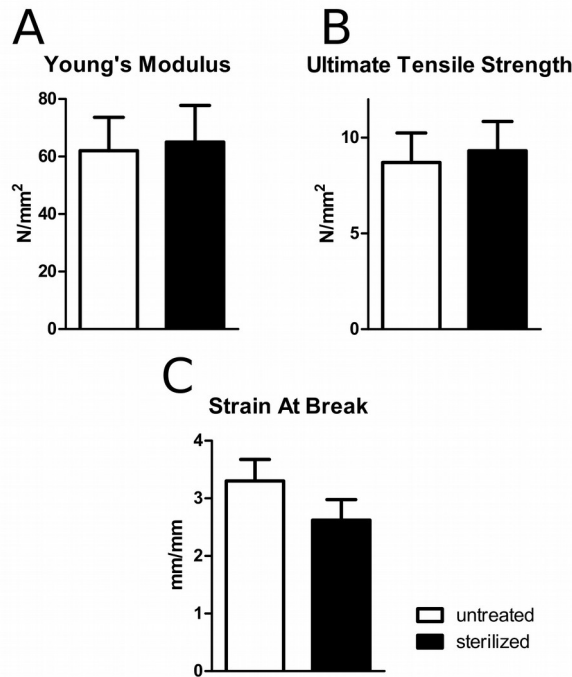


Fig. 2. (A) Electrospun vascular grafts had an inner diameter of 4 mm, wall thickness of  $90.6 \mu\text{m} \pm 1.0 \mu\text{m}$  and a length of 45 mm. (B) On electron micrographs of wall cross sections, no boundaries or gaps between three layers of different polymer blends could be seen. On the left, the outer surface of the graft is visible. (C) Cytotoxicity testing of the graft material compared cell numbers after 24 hrs incubation with conditioned media, with no significant difference between graft and null control. Null = untreated media, Negative = incubated non-toxic polyethylene samples, Graft = incubated with graft material, Positive = 0.5 % SDS. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$ , Student's  $t$ -test.

After sterilization, no significant changes in material properties were observed (Fig. 3). Young's modulus of  $62 \pm 11.6 \text{ N/mm}^2$  and  $65 \pm 12.7 \text{ N/mm}^2$  was found for untreated and gamma sterilized grafts, respectively (Fig. 3 A). Ultimate tensile strength with a value of  $8.7 \pm 1.5 \text{ N/mm}^2$  (untreated) and  $9.3 \pm 1.5 \text{ N/mm}^2$  (gamma sterilized) was observed (Fig. 3 B). Strain at break decreased non-significantly from  $3.3 \text{ mm/mm} \pm 0.37$  (untreated) to  $2.6 \pm 0.36 \text{ mm/mm}$  (gamma sterilized) (Fig. 3 C).

### Dynamic *in vitro* hemocompatibility testing

In all experiments, no relevant increase of the index of hemolysis (IH) was observed after hemocompatibility testing. An index of hemolysis of  $0.27 \pm 0.028 \%$  was found before experiments (null value). A comparable value of  $0.30 \pm 0.018 \%$  and  $0.29 \pm 0.006 \%$



*Fig. 3. Tensile testing of sterilized and non-sterilized grafts. (A, B) No notable difference in Young's modulus and ultimate tensile strength was observed after sterilization. (C) A slight decrease in strain at break was not significant. Mean  $\pm$  SEM, all  $n = 8$ , tested by Student's *t*-test.*

was observed for non-seeded grafts and endothelialized grafts, respectively. Coagulation time decreased for all samples compared to average null value of 60.6 s. However, the induced decrease was not different between the tested tubes. A decrease to  $87.5 \pm 6.9 \%$ ,  $80.6 \pm 4.6 \%$  and  $84.8 \pm 7.4 \%$  of null value was recorded for control, non-seeded grafts and endothelialized grafts, respectively (Fig. 4 A).

In contrast, seeding of the tubes with endothelial cells drastically reduced platelets loss. Relative to null value, the decrease in platelet number was  $83.1 \pm 4.0 \%$  and  $71.0 \pm 5.3 \%$  in control and non-seeded graft experiments. In endothelialized grafts, almost no platelet ( $98.3 \pm 0.8 \%$ ) loss was observed (Fig. 4 B).

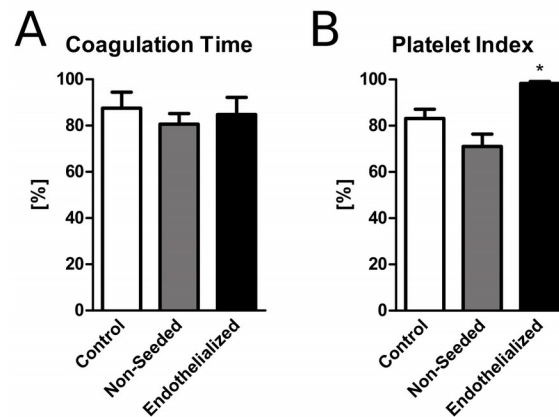
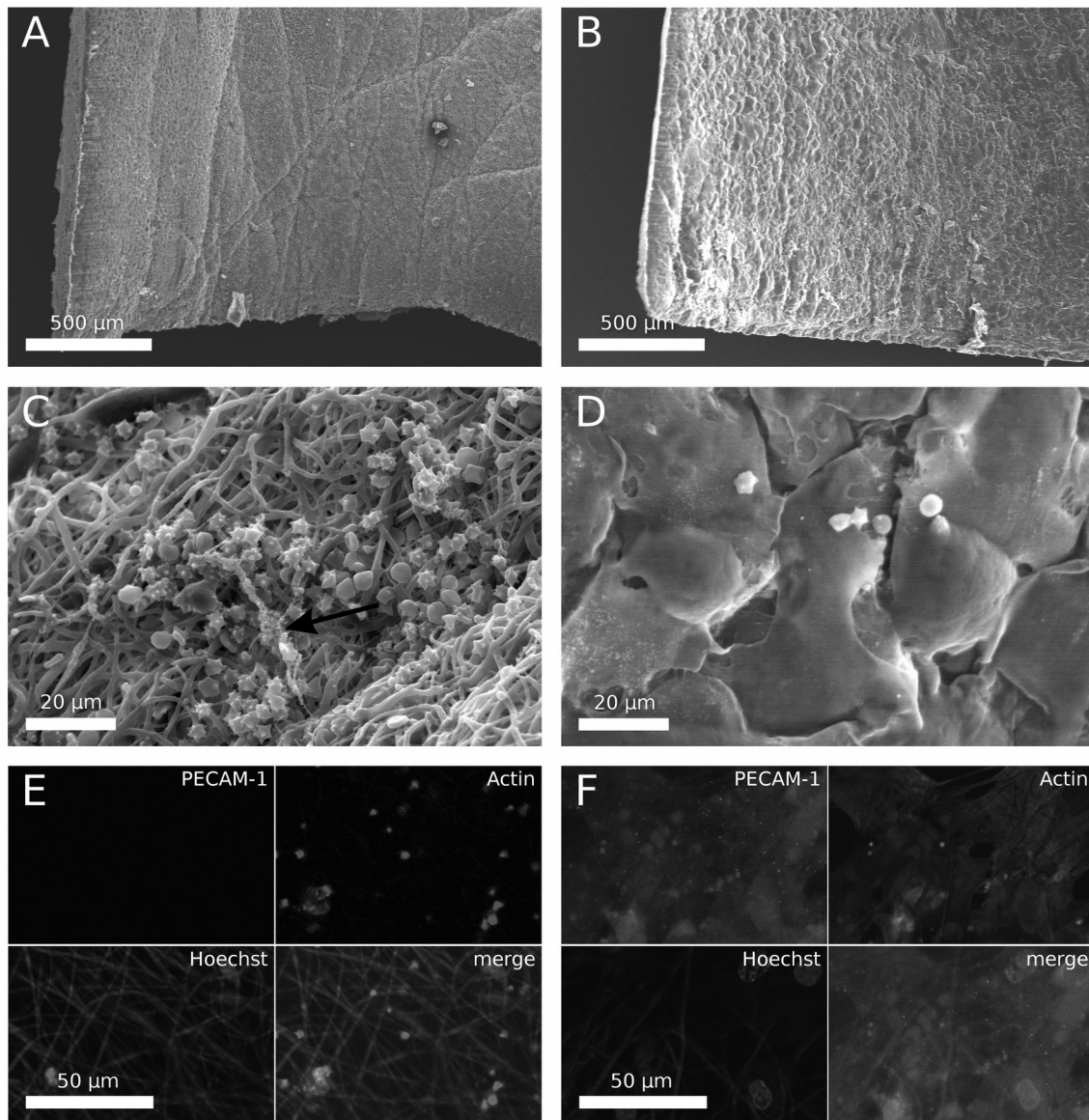


Fig. 4. Change in coagulation time and platelet index after dynamic hemocompatibility testing of non-seeded and endothelialized grafts versus empty tube control. (A) Initial coagulation time of 60.6 s was decreased after all experiments with no significant differences between groups. (B) The non-seeded grafts led to a reduction in platelet count compared to control, whereas the endothelialized graft showed almost no platelet loss. Mean  $\pm$  SEM, all  $n = 6-8$ , asterisk indicates significant difference to control ( $p > 0.05$ , one-way ANOVA with Dunnett's test).

SEM images of the inner graft surface showed blood cell adhesion on the non-seeded grafts (Fig. 5 A, C) as well as on endothelialized grafts that were covered with an endothelial monolayer (Fig. 5 B, D). Spatial abundance of activated platelets and fibrin fiber formation varied greatly on all samples, being however higher on non endothelialized grafts. In non-seeded grafts, platelets were visible as enucleated cells in actin stain (Fig. 5 E). Fiber morphology was visible by slight autofluorescence in the Hoechst channel. Endothelial cells in endothelialized grafts were identified by PECAM staining (Fig. 5 F), covering fiber structures. Cells showed a typical cobblestone morphology and showed no ingrowth into the fiber matrix.



*Fig. 5. Non-seeded (left column) and endothelial cell seeded (right column) grafts after hemocompatibility experiments. (A, B) Macroscopic appearance, SEM images. (C, D) Activated platelets and red blood cells could be found on both samples, but in higher density on non-seeded grafts. Arrow indicates fibrin fibers; abundance of thrombi and blood cells varied spatially on all samples. (E, F) PECAM-1, actin and Hoechst stain showed nucleated and non-nucleated blood cells on non-seeded grafts and endothelial cells on seeded grafts. Through autofluorescence, polymer fibers could be detected in Hoechst channel.*



## Discussion

In this study, we showed the manufacture of electrospun vascular grafts, followed by mechanical testing, seeding with primary endothelial cells and *in vitro* testing using the Chandler Loop setup. Different methods of sterilization were evaluated – a procedure that is only addressed by few publications in the field of vascular tissue engineering. Furthermore, ethanol disinfection in place of sterilization is still common (15). We found that all tested techniques, such as autoclaving, ethylene oxide, plasma (data not shown in this study) as well as gamma ray indeed had an impact on material characteristics. Gamma ray sterilization had the least influence as it only non-significantly increased the material stiffness and was chosen for our samples. Similar findings have been reported before in studies on PCL films or knitted PCL stents (16,17). Also it should be taken into consideration that sterilization procedures also can influence polymer degradation rates (18–20).

For the graft wall composition, a three-layered structure was chosen. We believe that the outer hydrophilic PCL/PLA layers provide an optimal environment for cell growth. The luminal layer allows optimal endothelial cell adherence, while the outer layer improves embedding in the surrounding connective tissue. For a functional, degradable tissue engineering product, cellular ingrowth and appropriate vascularization are crucial for nutrient supply and immune defense. The pure PCL core exhibits slightly slower degradation rates and is intended to ensure graft stability while host tissues are regenerating. The approach of three-layered vascular grafts has been addressed in earlier studies by other researchers as well as by our group (21–23).

In a previous study, we found a severe foreign body reaction of unknown cause when using neural implants with a PCL fiber sheath in an animal model (24). Still, results from other groups as well as cytotoxicity testing in this study show that PCL is a promising and suitable polymer for the production of vascular graft material.

The Chandler Loop is a well-accepted technique that allows *in vitro* evaluation of blood damage caused by implants. Although it is possible to measure complement activation in Chandler Loop studies by ELISA (25), immune reactions of the blood samples can be neglected. Porcine blood is an adequate testing substance for implants intended for human or animal experiment use (26,27). With this setup, we could show that non-seeded grafts did not evoke noticeable blood damage by hemolysis. Coagulation time was reduced by the samples as well as in the control. The coagulation cascade is triggered by the activation of platelets as well as proteins of the coagulation system due to the contact with a biomaterial. This effect usually leads to a decrease in coagulation time compared to null values.

A quantification of activated platelets attached to the sample surface via SEM images was not conducted. Firstly, spatial platelet density on both endothelialized and non-seeded samples varied greatly. This may be caused by the rinsing procedure before fixation or by different local shear stress. Secondly, comparing the number of adherent platelets does not take activated platelets into account, that do not stick but form aggregates and are lost after rinsing samples (28).

As it has been reported for similar experiments using conventional and experimental artificial grafts (29), our non-seeded grafts evoked a certain platelet activation as seen in the reduction of platelet index. In marked contrast to empty Chandler Loop control and non-seeded grafts, there was almost no platelet loss in grafts seeded with primary

endothelial cells (Fig. 3 B). Endothelial cells are known to exert anti-thrombogenic properties based on: (i) the inhibition of blood contact to subendothelial tissue (or artificial material), (ii) membrane bound factors like heparin or surface charge and (iii) secreted factors like prostaglandins (see Sarkar *et al.* (30) for artificial grafts related review). Here, we conclude that the presence of endothelial cells improved the overall hemocompatibility our electrospun vascular grafts.

## Conclusion

We showed the successful seeding of three-layered electrospun vascular grafts. The use of a seeding bioreactor in combination with a controlled rotating device allowed a highly reproducible seeding protocol. To our knowledge, this is the first study conducting dynamic *in vitro* hemocompatibility testing of electrospun vascular grafts. Hemocompatibility was strikingly improved when the material was covered with endothelium.

Spontaneous endothelialization of comparable grafts occurred in the time scale of weeks to months (10,11), and there is evidence that spontaneous graft endothelialization will be distinctly slower in human patients than observed in many animal models (30,31). For this reason, we believe that *in vitro* endothelialization is a key to successful tissue engineered vascular grafts.

Acknowledgements: We would like to thank Julia Panitz, Johannes Stegmann and Tobias Rusiecki for their technical and experimental support.

This work was kindly financially supported by the German Research Foundation (DFG, Bonn, Germany) within the Collaborative Research Area SFB/TR 37 “Micro and nanosystems in medicine – Reconstruction of biological functions”, project B4.

Conflict of Interest: None declared.

## References

1. Chlupác J, Filová E, Bacáková L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 2009;58 Suppl 2:S119–39.
2. Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen. Med.* 2010;5:107–20.
3. Szentivanyi AL, Zernetsch H, Menzel H, Glasmacher B. A review of developments in electrospinning technology: new opportunities for the design of artificial tissue structures. *Int. J. Artif. Organs.* 2011;34:986–97.
4. Palumbo VD, Bruno A, Tomasello G, Damiano G, Lo Monte AI. Bioengineered vascular scaffolds: the state of the art. *Int. J. Artif. Organs.* 2014;37:503–12.
5. Kumar VA, Brewster LP, Caves JM, Chaikof EL. Tissue Engineering of Blood Vessels: Functional Requirements, Progress, and Future Challenges. *Cardiovasc. Eng. Technol.* 2011;2:137–48.

6. Zhao J, Qiu H, Chen D, Zhang W, Zhang D, Li M. Development of nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013;56:106–13.
7. Yokota T, Ichikawa H, Matsumiya G, et al. In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2008;136:900–7.
8. Tillman BW, Yazdani SK, Lee SJ, Geary RL, Atala A, Yoo JJ. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials.* 2009;30:583–8.
9. Simon P, Hoerstrup, Cummings I, Lachat M, et al. Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: follow-up at 100 weeks in a large animal model. *Circulation.* 2006;114:1159–66.
10. De Valence S, Tille J-C, Mugnai D, et al. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. *Biomaterials.* 2012;33:38–47.
11. Zheng W, Wang Z, Song L, et al. Endothelialization and patency of RGD-functionalized vascular grafts in a rabbit carotid artery model. *Biomaterials.* 2012;33:2880–91.
12. Jordan M, Mueller M, Kortlepel R, Glasmacher B. Modified Chandler Loop system for dynamic hemocompatibility testing of vascular implants. *Biomed Tech (Berl).* 2014;59:38–41.
13. Chandler AB. In vitro thrombotic coagulation of the blood; a method for producing a thrombus. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 1958;7:110–4.

14. Gardner RA. An examination of the fluid mechanics and thrombus formation time parameters in a Chandler rotating loop system. *J. Lab. Clin. Med.* 1974;84:494–508.
15. Gualandi C, Govoni M, Foroni L, et al. Ethanol disinfection affects physical properties and cell response of electrospun poly(l-lactic acid) scaffolds. *Eur. Polym. J.* 2012;48:2008–18.
16. Nuutinen J-P, Välimaa T, Clerc C, Törmälä P. Mechanical properties and in vitro degradation of bioresorbable knitted stents. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2002;13:1313–23.
17. Cottam E, Hukins DWL, Lee K, Hewitt C, Jenkins MJ. Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material. *Med. Eng. Phys.* 2009;31:221–6.
18. Rainer A, Centola M, Spadaccio C, et al. Comparative study of different techniques for the sterilization of poly-L-lactide electrospun microfibers: effectiveness vs. material degradation. *Int. J. Artif. Organs.* 2010;33:76–85.
19. Dorati R, Colonna C, Serra M, et al. gamma-Irradiation of PEGd,PLLA and PEG-PLGA multiblock copolymers. I. Effect of irradiation doses. *AAPS PharmSciTech.* 2008;9:718–25.
20. Yoshii F, Darwis D, Mitomo H, Makuuchi K. Crosslinking of poly( $\epsilon$ -caprolactone) by radiation technique and its biodegradability. *Radiat. Phys. Chem.* 2000;57:417–20.
21. Iwasaki K, Kojima K, Kodama S, et al. Bioengineered three-layered robust and elastic artery using hemodynamically-equivalent pulsatile bioreactor. *Circulation.* 2008;118:S52–7.

22. McClure MJ, Sell SA, Simpson DG, Walpoth BH, Bowlin GL. A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: a preliminary study. *Acta Biomater.* 2010;6:2422–33.

23. Pfeiffer D, Stefanitsch C, Wankhammer K, et al. Endothelialization of electrospun polycaprolactone (PCL) small caliber vascular grafts spun from different polymer blends. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2014;102:4500–9.

24. Duda S, Dreyer L, Behrens P, et al. Outer Electrospun Polycaprolactone Shell Induces Massive Foreign Body Reaction and Impairs Axonal Regeneration through 3D Multichannel Chitosan Nerve Guides. *BioMed Res. Int.* 2014;2014:1–16.

25. Streller U, Sperling C, Hübner J, Hanke R, Werner C. Design and evaluation of novel blood incubation systems for in vitro hemocompatibility assessment of planar solid surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2003;66:379–90.

26. Klaus S, Körfer S, Mottaghy K, Reul H, Glasmacher B. In vitro blood damage by high shear flow: human versus porcine blood. *Int. J. Artif. Organs.* 2002;25:306–12.

27. Paul R, Apel J, Klaus S, Schügner F, Schwindke P, Reul H. Shear stress related blood damage in laminar couette flow. *Artif. Organs.* 2003;27:517–29.

28. Ratner BD. The catastrophe revisited: blood compatibility in the 21st Century. *Biomaterials.* 2007;28:5144–7.

29. Fink H, Hong J, Drotz K, Risberg B, Sanchez J, Sellborn A. An in vitro study of blood compatibility of vascular grafts made of bacterial cellulose in comparison with conventionally-used graft materials. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2011;97A:52–8.

30. Sarkar S, Sales KM, Hamilton G, Seifalian AM. Addressing thrombogenicity in vascular graft construction. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2007;82:100–8.

31. Ratner BD, editor. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press; 2004.



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern Frau Prof. Glasmacher und Herrn Prof. Ngezahayo für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die Ressourcen, die mir zur Verfügung gestellt wurden.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mehrphasenprozesses und des Instituts für Biophysik bedanken, ohne euch hätte ich diese Arbeit nie durchführen können. Ihr habt mir eine sehr wertvolle und im positiven Sinne nerdige Zeit an beiden Instituten bereitet.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht haben. Ohne euch wäre ich jetzt nicht hier. Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner geliebten Sonja.