

*Abschlussbericht zum
Forschungsprojekt*

„ Etablierung einer longitudinalen
Nervenleitschienen-Matrix aus
autologem Plasma zur gerichteten
Nervenregeneration“
(412.02-FR-219)

Laufzeit

01.01.2014 – 31.12.2015

Bericht vom 04.02.2016

Prof. Dr. rer. nat. Manfred Köller

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch

Kurzfassung englisch

1. Problemstellung
2. Forschungszweck/-ziel
3. Methodik
4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens
5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen
6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen
7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Kurzfassung deutsch

Die Versorgung peripherer Nervendefekte mit Autograft ist nicht immer möglich und Alternativen werden im Bereich regenerativer Zelltherapie und Biomaterialien gesucht. Die Verwendung einer autologen Plasma-Matrix als Füllmaterial von Nervenleitschienen ist vielversprechend, weil ausschließlich autologes Material eingesetzt wird und weitere allogene oder xenogene Zusätze nicht nötig werden.

In dieser *in vitro* Studie wurde deswegen auf der Basis eines Plasmaclots eine längsgerichtete Fibrin-Matrix entwickelt, um regenerierende Nervenzellen gerichtet durch stabilitätsgebende Leitschienen zu führen. Für die Herstellung der Plasmaclot-Matrix wurde thrombozytenfreies Plasma verwendet, das durch Zentrifugation aus Citrat-Blut freiwilliger Spender gewonnen wurde. Die Clot-Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur für 60 min unter verschiedenen Versuchsbedingungen: statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation), im elektrischen Feld und unter unidirektionaler Bewegung (Flow-Bedingungen). In einem selbst entwickelten Nervenleitschienen-Modellen wurden ursprünglich ungerichtete Fibrinfasern bereits beim Clottingprozess durch die genannten Versuchsbedingungen ausgerichtet und mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) sowie konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) analysiert. Die resultierenden REM- bzw. LSM-Bilder wurden mit der Fast Fourier Transformation (FFT) ausgewertet. Dabei wurde von den FFT-Plots die Halbwertsbreite (Full Width at Half Maximum, FWHM) und die Peak Area Xmin to Xmax bestimmt sowie der Ausrichtungs-Index (Alignment Index) berechnet.

Kontrollclots formten ein zufällig organisiertes, relativ homogenes Fibrin-Netzwerk, während Clots unter Flowbedingungen als auch im elektrischen Feld längs orientierte Fibrinfasern aufwiesen. Die Ausrichtung der Fasern erfolgte hierbei in Flow-Richtung bzw. in Richtung der elektrischen Feldlinien. Zugesezte neurale Stammzellen (H9) oder mesenchymale Stammzellen (MSC) blieben nach jeweiliger Faserausrichtung vital und passten sich morphologisch an die längs orientierten Fibrinfasern an.

Desweiteren wurde ein Migrationsmodell auf der Basis einer gerichteten bzw. einer ungerichteten Plasmaclot-Matrix zur Simulation einer Nervenleitschiene mit integrierten Fibrinfasern entwickelt und ein Chemotaxis-Assay mit PMN, MSC und H9-Zellen etabliert. Die Ausbildung des Chemokingradienten in der Plasmaclot-Matrix wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran überprüft. Anschließend wurde die Sensitivität der Zellen auf unterschiedliche potentiell chemotaktische Faktoren analysiert und quantifiziert.

Die optimierten Fibrinmatrices wurden abschließend in klinisch zugelassenen Chitosan-Konduits getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Kombination eines hohlen Nerven-Konduits

mit einer autologen gerichteten Plasmaclot-Matrix eine mögliche neue Methode zur Unterstützung der peripheren Nervenregeneration ist.

Kurzfassung englisch

Treatment of peripheral nerve defects using autograft is not always possible and alternatives are offered in the field of regenerative cell therapy and biomaterials. The use of an autologous plasma matrix as a filler for nerve conduits is promising as only autologous material is used and additional allogeneic or xenogeneic additives are not necessary.

In this in vitro study a longitudinally aligned fibrin matrix on the basis of a plasma clot was designed in order to guide regenerating nerve cells directionally through conduits. Platelet-free plasma was used for the production of the plasma clot matrix, which was obtained by centrifugation of citrated blood from volunteers. The clot polymerization was carried for one hour at room temperature using different experimental conditions: a static control (without further manipulation), application of an electric field and under unidirectional movement (flow conditions). Originally undirected fibrin fibers were readily aligned during the clotting-process under the experimental conditions, but not in the control as shown by a self-developed nerve conduit model. Fiber alignment was analyzed by means of scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (LSM). Output images were processed using fast Fourier transformation (FFT). Full width at half maximum (FWHM) and peak area (Xmin to Xmax) as well as the alignment index of the FFT-graph plots were calculated to determine the relative degree of fiber alignment.

Control clots formed a randomly organized, relatively homogenous fibrin network. In contrast, under flow conditions as well as in the electric field, clots showed longitudinal-orientated fibrin fibers. The orientation of the fibers was parallel to the flow direction or to the electrical-field lines. Added neural stem cells (H9) or mesenchymal stem cells (MSC) remained viable and exhibited a longitudinal orientation along the aligned fibrin fibers.

Furthermore, a migration model has been developed on the basis of an aligned or non-aligned plasma clot to simulate a nerve-conduit with integrated fibrin fibers and a chemotaxis assay was established using PMN, MSC and H9 cells. The formation of the chemokine gradient in the plasma clot matrix was demonstrated with the fluorescent dye FITC-dextran. Subsequently, the sensitivity of the cells to different potentially chemotactic factors was analyzed and quantified.

The optimized fibrin matrices were finally tested using commercial clinically approved chitosan conduits. Results showed that the combination of hollow nerve conduits with an autologous directed plasma clot matrix is a potential new method for promoting peripheral nerve regeneration.

1. Problemstellung

Die Verwendung von autologen Nerven­transplantaten ist zurzeit die Methode der Wahl bei Nervenläsionen im peripheren Nervensystem. Diese autologe Nerven­transplantation hat klinisch auch Nachteile, wie die limitierte Verfügbarkeit sowie einen möglicherweise komplikationsbehafteten zusätzlichen operativen Eingriff. Desweiteren kann es zur Ausbildung schmerzhafter Neurome oder einer Infektion kommen. Aufgrund der genannten Problematik wurde in den letzten Jahren die Entwicklung von künstlichen Nerven­implantaten, die zur Überbrückung von Nerven­defekten eingesetzt werden sollen, vorangetrieben. Mit diesen künstlichen Nerven­implantaten soll einerseits die Morbidität an der Nervenentnahmestelle vermieden bzw. reduziert und andererseits eine ausreichende Anzahl an transplantierbaren Nerven zur Verfügung gestellt werden. Bei allen bereits klinisch zugelassenen Nerven­leitschienen handelt es sich um ungefüllte Hohlröhren aus natürlichen oder synthetischen Polymeren. Eine Herausforderung ist daher die Konstruktion von gefüllten Nerven­leitschienen mit gerichteten internen autologen Strukturen zur Leitung von Nervenzellen.

2. Forschungszweck/-ziel

Ziel dieses Projektes war es, auf der Basis eines autologen Plasmaclots eine längsgerichtete Fibrin-Matrix zu entwickeln, um regenerierende Nervenzellen gerichtet durch stabilitätsgebende Leitschienen zu führen. Die Verwendung einer autologen Plasma-Matrix zur Nervenregeneration ist ideal, weil ausschließlich autologes Material eingesetzt wird und allogene oder xenogene Zusätze nicht nötig sind. Für die Herstellung der Plasmaclot-Matrix sollte thrombozytenfreies Plasma verwendet werden, das durch Zentrifugation aus Citrat-Blut freiwilliger Spender gewonnen wurde. Die Clot-Polymerisation sollte bei Raumtemperatur für 60 min unter folgenden verschiedenen Versuchsbedingungen erfolgen: statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation), im elektrischen Feld und unter Flow-Bedingungen. In selbst entwickelten Nervenleitschienen-Modellen sollten ursprünglich ungerichtete Fibrinfasern bereits beim Clottingprozess durch die oben genannten Koagulationsbedingungen ausgerichtet und mittels REM- und FFT-Analyse untersucht werden. Desweiteren sollte mit Hilfe der Fluoreszenz- bzw. konfokalen Laser-Mikroskopie geprüft werden, ob zugesetzte neuronale Stammzellen (H9) nach jeweiliger Faserausrichtung eine dementsprechende Orientierung nach Zellkultur erreichen. Zusätzlich sollten mesenchymale Stammzellen (MSC) diese Migration fördern. Um die Migrationsgeschwindigkeit von fluoreszenzmarkierten Stammzellen in den unterschiedlichen Fibrinmatrices unter Einfluss neurotropher Faktoren zu messen, sollten mittels Fluoreszenzmikroskopie mikroskopische Serienaufnahmen migrierter Zellen angefertigt werden. Optimierte Fibrinmatrices sollten abschließend im 2. Antragsjahr in klinisch einsetzbaren Konduits getestet werden.

3. Methodik

3.1 Arbeits- und Zeitabläufe

3.1.1 Geplante Arbeits- und Zeitabläufe

Folgende Arbeitsschritte waren zu Projektbeginn vorgesehen:

1. Clot-Polymerisation im elektrischen Feld

- Optimierung der Plasmaclot-Matrices (Plasmaanteil, CaCl_2 -Zugabe)
- Optimierung der Nervenleitschienenmodelle und der Prozessparameter
- REM-Analyse der Plasmaclot-Matrices und Berechnung der Faserdicke

2. Clot-Polymerisation unter Flow-Bedingungen

- Optimierung der Prozessparameter
- REM-Analyse der Plasmaclot-Matrices und Berechnung der Faserdicke

3. Clot-Polymerisation unter Flow im elektrischen Feld

- Optimierung der Prozessparameter (Flow + konstanter Strom)
- REM-Analyse der Plasmaclot-Matrices und Berechnung der Faserdicke

4. Einfluss der unterschiedlichen Fibrinmatrices auf mesenchymale bzw. neuro- nale Stammzellen

- Überprüfung der Zellviabilität, der –proliferation und –orientierung
- Analyse der Zellorientierung mittels konfokaler Lasermikroskopie
- Etablierung und Durchführung Migrationsanalyse mittels Fluoreszenzmikroskopie
- Chemotaxis Assay mit HTS Fluoroblok Zellkultureinsätzen
- Chemotaxis Assay mit dem Migrationsmodell
- Immunhistochemische Analyse der Stammzellen

5. Analyse und Auswertung der Untersuchungen

- FFT-Analyse der REM-Bilder (Faserausrichtung, FWHM)
- Auswertung der Migrationsanalyse mit ImageJ
- Dokumentation der Ergebnisse
- Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse

In Tabelle 1 ist der initial geplante Zeitablauf der Arbeitsschritte dargestellt.

Tab. 1: Geplanter Zeitablauf der Arbeitsschritte.

Arbeitsschritte laut Antrag	1. Jahr												2. Jahr											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Arbeitsschritt 1: Clot-Polymerisation im elektrischen Feld	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■												
Optimierung der Plasmaclot-Matrices (Plasmaanteil, CaCl ₂ -Zugabe)	■	■	■																					
Optimierung der Nervenleitschienenmodelle und der Prozessparameter	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■												
REM-Analyse der Plasmaclot-Matrices und Berechnung der Faserdicke				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						
Arbeitsschritt 2: Clot-Polymerisation unter Flow-Bedingungen	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■												
Optimierung der Prozessparameter	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■												
REM-Analyse der Plasmaclot-Matrices und Berechnung der Faserdicke				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						
Arbeitsschritt 3: Clot-Polymerisation unter Flow im elektr. Feld	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■												
Optimierung der Prozessparameter (Flow + konstanter Strom)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■												
REM-Analyse der Plasmaclot-Matrices und Berechnung der Faserdicke				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						
Arbeitsschritt 4: Einfluss der unterschiedlichen Fibrinmatrices auf mesenchymale bzw. neuronale Stammzellen													■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Überprüfung der Zellviabilität, der –proliferation und -orientierung	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Analyse der Zellorientierung mittels konfokaler Lasermikroskopie													■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Etablierung und Durchführung Migrationsanalyse mittels Fluoreszenzmikroskopie	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Chemotaxis Assay mit HTS Fluoroblok Zellkultureinsätzen													■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Chemotaxis Assay mit dem Migrationsmodell													■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Immunhistochemische Analyse der Stammzellen													■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Arbeitsschritt 5: Analyse und Auswertung der Untersuchungen													■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FFT-Analyse der REM-Bilder (Faserausrichtung, FWHM)													■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Auswertung der Migrationsanalyse mit ImageJ													■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Dokumentation der Ergebnisse																						■	■	■
Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse																						■	■	■
Arbeitsschritt 6: Zwischenbericht												■												

3.1.2 Tatsächliche Arbeits- und Zeitabläufe

Die in Abschnitt 3.1.1 erläuterten geplanten Arbeitsschritte konnten im Verlauf des Projektes verwirklicht werden. Es wurden zusätzlich weitere ergänzende Untersuchungen erforderlich:

Chemotaxis-Experimente:

- Um die Zellmigration von H9-Zellen zu induzieren, wurden sowohl im FluoroBlok-Chemotaxis Assay als auch im Migrationsmodell anstelle von rekombinanten Chemokinen MSC direkt als Chemokinproduzenten eingesetzt.

Migrationsmodell:

- Zur Überprüfung der Ausbreitung des Konzentrationsgradienten in einem gerichteten bzw. ungerichteten Plasmaclot wurden zusätzlich Farbstoffexperimente mit FITC-Dextran eingesetzt.
- Zur Etablierung der 3D-Chemotaxis im Migrationsmodell wurden ergänzend neutrophile Granulozyten, stellvertretend für schnell migrierende Zellen, verwendet.

Testung der optimierten Fibrinmatrices in klinisch einsetzbaren Nerven-Konduits:

- Zunächst wurde als Vorversuche zur Überprüfung der Ausrichtungsmethoden im Konduit ein Teflon-Schlauch mit identischen Maßen wie die Chitosan-Konduits verwendet.

Erforderliche Versuchsänderungen:

Migrationsanalyse:

- Bei den 3D-Chemotaxis-Experimenten in der optimierten Migrationskammer konnten keine Aussagen über die Zellgeschwindigkeit und die Migrationsverläufe der einzelnen Zellen gemacht werden, da dafür ein inverses Time-Labs Fluoreszenzmikroskopie-System mit Zellinkubator erforderlich gewesen wäre. Das vorhandene Auflicht-Fluoreszenzmikroskop mit motorisiertem Mikroskoptisch erwies sich für die Migrationsversuche weniger geeignet, da die Auswertung durch die opake Plasmaclot-Matrix hindurch und durch die Ränder der schmalen Migrationskammern erschwert wurde. Daher erfolgte die Chemotaxis-Analyse alternativ mit einem inversem Laser-Scanning-Mikroskop. Um die Zellmigration im Plasmaclot in Richtung Chemokin zu analysieren, wurde eine Bildserie, bestehend aus vier hintereinander folgenden Abschnitten, direkt am Acrylglas-Schieber hergestellt. Anschließend wurden diese 4 Ausschnitte digital zusammengefügt, damit die gesamte Detektionszone am Acrylglas-Schieber entlang in einem Bild dargestellt werden konnte.

Immunhistochemische Analyse der Stammzellen im Plasmaclot:

- Die immunhistochemische Analyse der Zellen im Plasmaclot konnte aufgrund starker unspezifischer Hintergrundfärbungen im Clot nicht durchgeführt werden.

3.2 Verwendete Methoden

3.2.1 Herstellung der Plasmaclot-Matrices

Thrombozytenfreies Plasma wurde durch Zentrifugation (2000 x g, 45 min) aus Citrat-Blut freiwilliger Spender gewonnen. Zur Herstellung der Plasmaclot-Matrices wurden zwei unterschiedliche Clot-Kombinationen getestet, die sich hinsichtlich des zugegebenen Plasmaanteils unterschieden. Eingesetzt wurden dabei ein Plasmaanteil von 50% und 75% zum Clot-Gemisch. Zur Polymerisationsinitiierung der Plasmaclots wurden dann unterschiedliche Calciumkonzentrationen getestet (1%-6% vom Plasmaanteil). Zur Beurteilung der Faserausrichtung mittels konfokaler Lasermikroskopie wurden die Plasmaclots zusätzlich mit 0,1%igem humanen Fibrinogen (Alexa Fluor 594 konjugiert, Invitrogen) markiert.

Die Clot-Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur für 90 min unter folgenden verschiedenen Versuchsbedingungen:

- statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation)
- unter Flow-Bedingungen auf einem Wippschüttler und auf einem Horizontalschüttler
- im elektrischen Feld
- unter Flow-Bedingungen im elektrischen Feld.

Im ersten Jahr dieser Studie stand zunächst die Prozessoptimierung dieser unterschiedlichen Ausrichtungsmethoden als auch die Charakterisierung der hergestellten Fibrinmatrices mit längs gerichteten Fibrinfasern im Vordergrund.

3.2.2 Clot-Polymerisation unter Flow-Bedingungen

Für die Clot-Koagulation unter Flow-Bedingungen wurden der Wippschüttler IKA Rocker 2D Digital und der Horizontalschüttler IKA HS 500 (IKA, Staufen, Deutschland) eingesetzt (Abb. 1A und B).

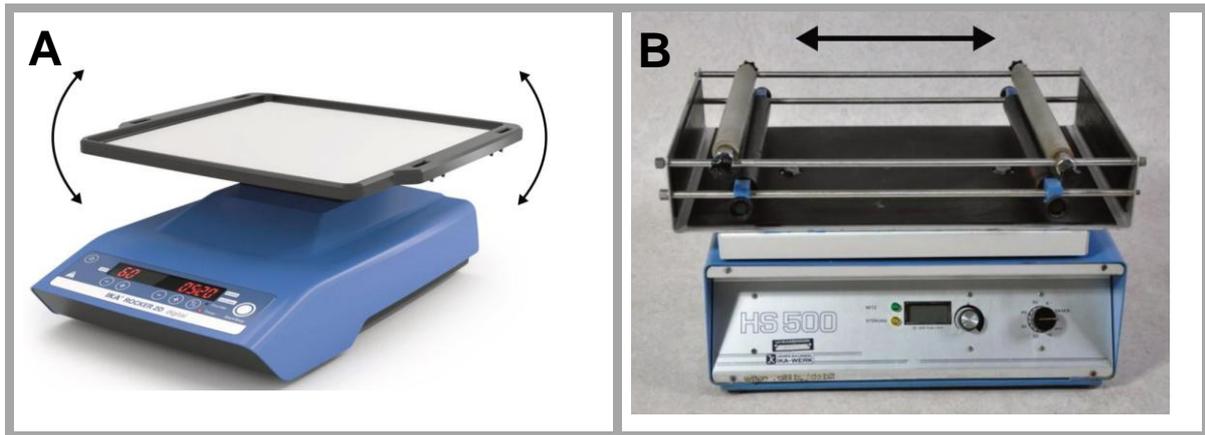


Abb.1A: Wippbewegung auf dem Wippschüttler. **B:** Horizontalbewegung auf dem Horizontalschüttler.

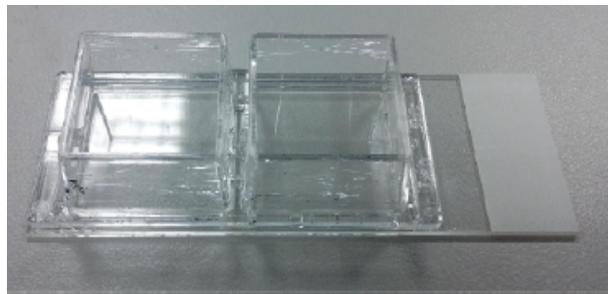


Abb. 2: Zweikammer-Objektträger

Zur Optimierung der Prozessparameter wurden hierbei für alle Versuche kommerziell erhältliche Zweikammer-Objektträger (Nunc, Dänemark) verwendet (Abb. 2) und für die Clot-Polymerisation Plasmaclots mit einem Ausgangsvolumen von 500µl Clotgemisch / Well eingesetzt. Zur Polymerisation der Plasmen wurde eine

Calciumzugabe von 5% (vom Plasmavolumen) gewählt, die bei allen Polymerisationsbedingungen zu einer optimalen Vernetzungsdichte und Clotstabilität führte.

Folgende Prozessparameter wurden getestet:

- statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation)
- Einstellungen Wippschüttler: Neigungswinkel 5° - 10° / Wippbewegung 20 – 80 rpm
- Einstellungen Horizontalschüttler: 20 – 120 rpm

3.2.3 Clot-Polymerisation im elektrischen Feld

Die Clot-Polymerisation im elektrischen Feld erfolgte in einer eigens konstruierten Hochspannungskammer (Abb. 4A). Für die erforderliche Hochspannung wurde das Labor-Hochspannungsnetzteil HNCS35000-5 (Heinzinger) mit kontinuierlich einstellbarer Spannungs- und Stromregelung eingesetzt (Ausgangsstrombegrenzung: 0 bis 5 mA; Ausgangsspannung: einstellbar von 70 bis 35000 V DC) (Abb. 4B).

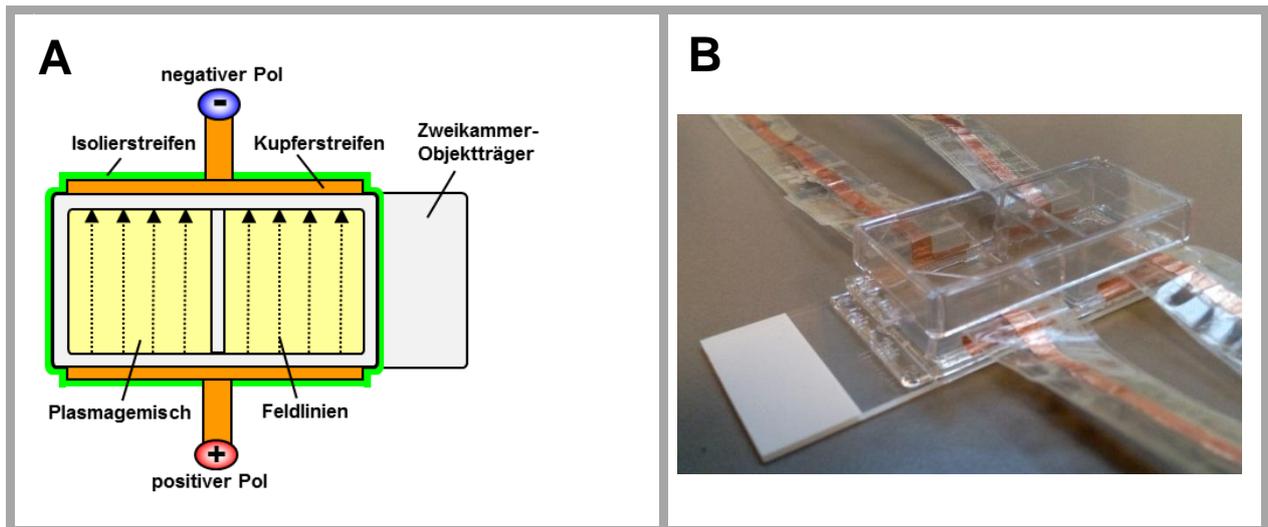


Abb. 3A: Experimentalschema für die Clot-Polymerisation im elektrischen Feld. Die Richtung der elektrischen Feldlinien verläuft von Plus nach Minus. **B:** Zweikammer-Objekträger mit aufgeklebten Kupferstreifen und Isolierstreifen.

Zur Optimierung der Prozessparameter wurden hierbei ebenfalls für alle Versuche kommerziell erhältliche Zweikammer-Objekträger (Nunc, Dänemark) verwendet. An beiden gegenüberliegenden Außenseiten der Kammern wurden mit Tesafilm isolierte Kupferstreifen (4 mm) geklebt (Abb. 3 A und 3B). Um einen elektrischen Kontakt herzustellen, wurde in der Mitte ein weiterer Kupferstreifen fixiert, der mit dem Pluspol bzw. Minuspol verbunden wurde (Abb. 4C und 4D). Für die Clot-Polymerisation wurden Plasmaclots mit einem Ausgangsvolumen von 500 μ l Clotgemisch / Well eingesetzt und zur Polymerisationsinitiierung der Clots 5% Calcium zum Clotgemisch zugegeben.

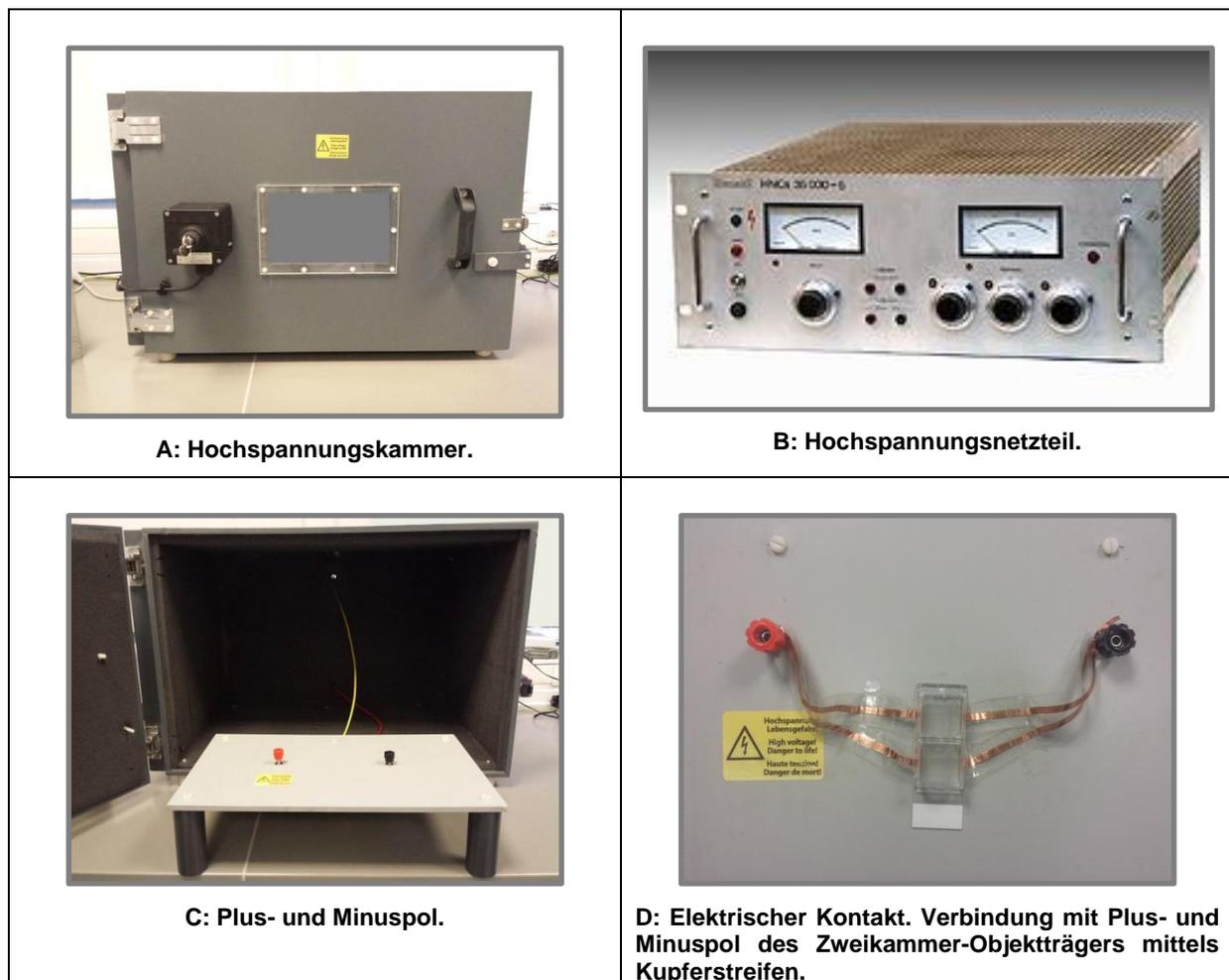


Abb. 4 A-D: Versuchsaufbau der Stromversuche.

Folgende Prozessparameter wurden getestet:

- statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation)
- Einstellungen Hochspannungsnetzteil: Strom 0,1 mA / Spannung 15 KV, 20 KV und 25 KV

3.2.4 Clot-Polymerisation unter Flow im elektrischen Feld

Die Clot-Polymerisation unter Flow im elektrischen Feld erfolgte in einer selbst gebauten Hochspannungskammer mit integriertem Plus- und Minuspol (Abb. 5A), die in der Hochspannungsschutzkammer auf den Wippschüttler (IKA Rocker 2D Digital) platziert wurde (Abb. 5B). Für die erforderliche Hochspannung wurde ebenfalls das Labor-Hochspannungsnetzteil HNCS35000-5 (Heinzinger) eingesetzt (Abb. 4B).

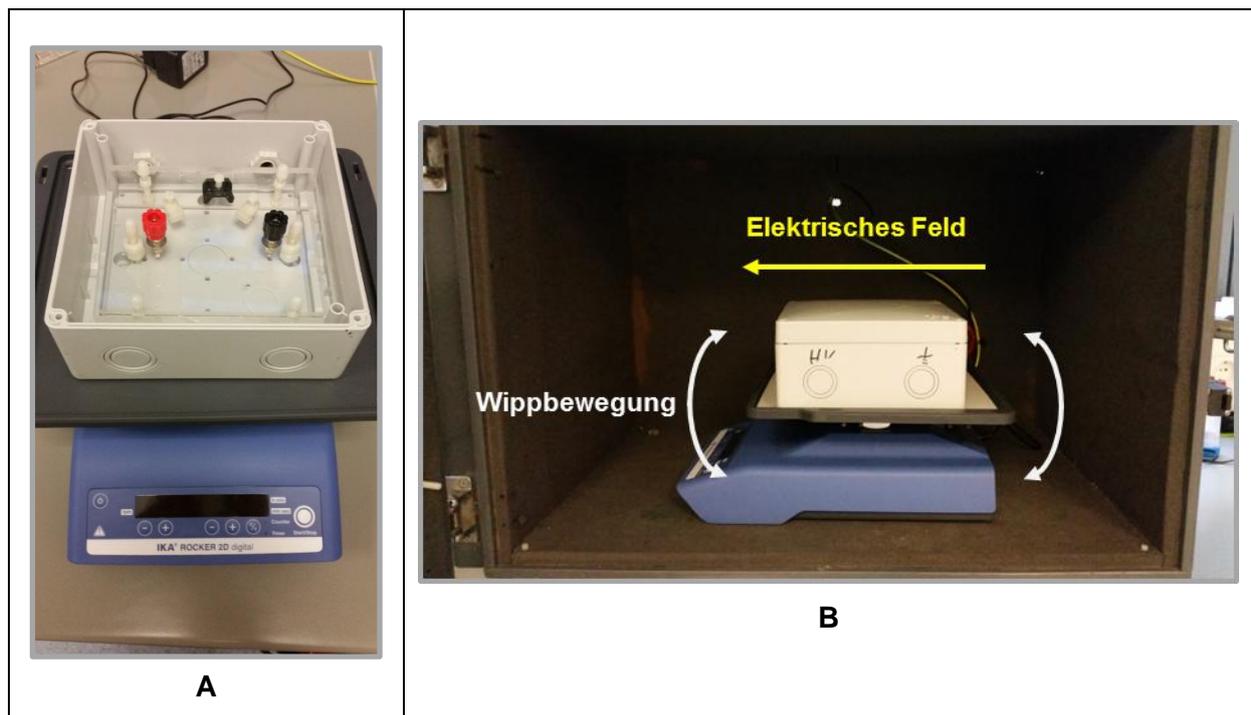


Abb. 5: Versuchsaufbau für die Clot-Polymerisation im elektrischen Feld unter Flow-Bedingungen.
A: Hochspannungskammer mit integriertem Plus- und Minuspol. **B:** Hochspannungskammer auf dem Wippschüttler in der Hochspannungsschutzkammer. Die Richtung des elektrischen Felds und die Wippbewegung sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Zur Optimierung der Prozessparameter wurden auch hier für alle Versuche kommerziell erhältliche Zweikammer-Objekträger (Nunc, Dänemark) verwendet, die wie bei den Stromversuchen ohne Flow mit isolierten Kupferstreifen beklebt wurden (siehe Abb. 3B). Um einen elektrischen Kontakt herzustellen, wurden ebenfalls die fixierten mittleren Kupferstreifen mit dem Pluspol bzw. Minuspol verbunden. Für die Clot-Polymerisation wurden Plasmaclots mit einem Ausgangsvolumen von 500 μ l Clotgemisch / Well eingesetzt und zur Polymerisationsinitiierung der Clots 5% Calcium zum Clotgemisch zugegeben.

Folgende Prozessparameter wurden getestet:

- statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation)
- Einstellungen Hochspannungsnetzteil: Strom 0,1 mA / Spannung 25 KV
- Einstellungen Wippschüttler: Neigungswinkel 5° / Wippbewegung 50 – 80 rpm

In den Versuchen wurde also ausschließlich die Wippgeschwindigkeit variiert, die Einstellung der Hochspannung wurde nicht verändert.

3.2.5 Optimierung der Nervenleitschienen-Modelle

3.2.5.1 Herstellung

Erst ein geeignetes Konzept, die Auswahl geeigneter Materialien und Fertigungstechnologien ermöglichten die adäquate Nachstellung zur Generierung einer gerichteten bzw. ungerichteten Plasmaclot-Matrix in einer Nervenleitschiene sowie deren optische Detektion. Ein weiterer wichtiger Punkt in dieser Konzeptphase war die Berücksichtigung der Herstellbarkeit und der Montage.

Das selbst entwickelte Nervenleitschienen-Modell wurde aus Polycarbonatkörpern (Länge: 76 mm; Breite: 26 mm; Höhe: 5 mm) mit 7 eingefrästen Leitschienen (Länge: 14 mm; Breite: 4,5 mm) in Kombination mit einem kommerziell erhältlichen Deckglas hergestellt (Abb. 6).

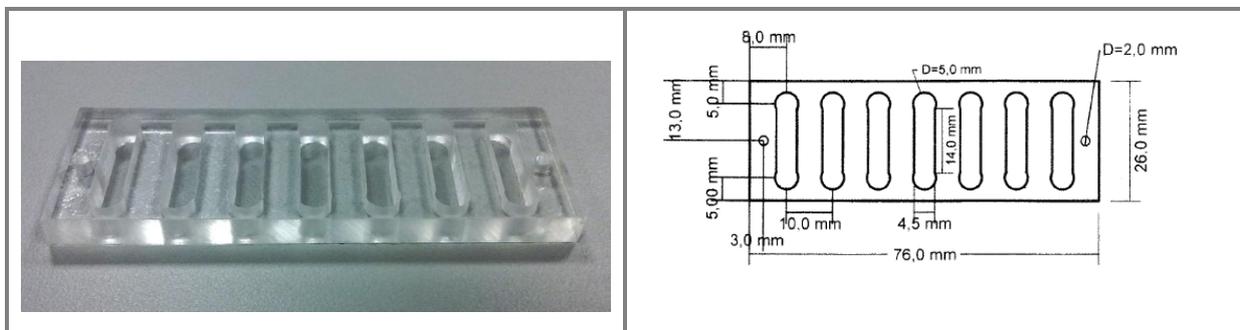


Abb. 6: Selbst entwickeltes Nervenleitschienen-Modell (links) und Skizze (rechts). Dieses Modell berücksichtigt hierbei die Füllgeometrie einer kommerziell erhältlichen Nervenleitschiene.

Polycarbonat wurde als Material ausgewählt, weil es folgende Eigenschaften besitzt:

- Transparenz,
- hohe Festigkeit und Härte,
- Biokompatibilität und daher Eignung für den Kontakt mit Zellen,
- keine Autofluoreszenz,
- Anwendungsbereich u.a. auch in der Medizin (Schläuche, Behälter).

Eine besondere Herausforderung stellte die Verklebung von dem Polycarbonatkörper mit dem Deckglas dar.

Folgende Auswahlkriterien waren dabei für die optimale Klebstoffauswahl entscheidend:

1. Der Klebstoff sollte mit den zu klebenden Materialien (Polycarbonat / Glas) verträglich sein, d.h. er sollte die erforderliche Festigkeit aufweisen, ohne die Materialien anzugreifen.
2. Es wurden nur lösungsmittelfreie Kleber eingesetzt, da einige Lösungsmittel zytotoxische Effekte in Zellkulturen auslösen können.

3. Für die Verbindung des durchsichtigen Polycarbonatkörpers mit dem Deckglas wurden ausschließlich geeignete transparente Klebstoffe eingesetzt, um den optischen Ansprüchen gerecht zu werden.
4. Weitere Faktoren, die eine Rolle spielten, waren die Beständigkeit des Klebstoffs gegen Feuchtigkeit, Temperatur (37°C im Brutschrank), Zellkulturmedium und bei einem mehrfachen Gebrauch.

Die getesteten Klebstoffe und deren Produkteigenschaften werden in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Getestete Klebstoffe mit folgenden Produkteigenschaften

Klebstoff	Chemische Basis	Aussehen	Komponenten	Viskosität	Aushärtung
Schwanheimer Industriekleber	Ethyl-2-cyanacrylat	Transparent, flüssig	Einkomponentig	Niedrig	Kontaktdruck / Sauerstoffentzug
Schwanheimer Industriekleber Gel	Ethyl-2-cyanacrylat	Transparent, gelartig	Einkomponentig	Hoch	Kontaktdruck / Sauerstoffentzug
Loctite AA 3311	Acryliertes Urethan	Transparent, flüssig	Einkomponentig	Niedrig	UV-Licht
Loctite AA 3494	Modifiziertes Acrylat	Transparent, flüssig	Einkomponentig	Mittel	UV-Licht

Schwanheimer Industriekleber und Schwanheimer Industriekleber Gel

Der Schwanheimer Industriekleber ist ein lösungsmittelfreier, auf Ethylester basierender Einkomponenten-Cyanacrylat-Klebstoff, der unter Druck aushärtet und unter Luftfeuchtigkeit spontan polymerisiert. Er ist transparent und niedrigviskös.

Das Schwanheimer Industriekleber Gel ist ebenfalls ein lösungsmittelfreier, auf Ethylester basierender Einkomponenten-Cyanacrylat-Klebstoff. Er ist transparent und hochviskös. Aufgrund der höheren Viskosität ist eine kurzzeitige Korrektur der Verklebung möglich. Im Vergleich zum Schwanheimer Industriekleber härtet er langsamer aus. Desweiteren unterscheidet er sich durch eine restelastische / flexible Aushärtung.

Anwendung

Beide Klebstoffe wurden jeweils auf dem Polycarbonatkörper mittels Tropfspitze und eines Pinsels dünn und gleichmäßig aufgetragen (Abb. 7). Durch kräftiges Anpressen des Deckglases auf den Polycarbonatkörper (Kontaktdruck / Sauerstoffentzug) wurde die Verklebung eingeleitet. Um Lufteinschlüsse zu vermeiden, wurde hierbei darauf geachtet, dass der Anpressdruck von der Mitte aus in alle Richtungen seitlich ging (Abb. 7).

Die Zeit bis zur Polymerisation betrug einige Minuten. Voll belastbar waren die Verklebungen nach 24h.

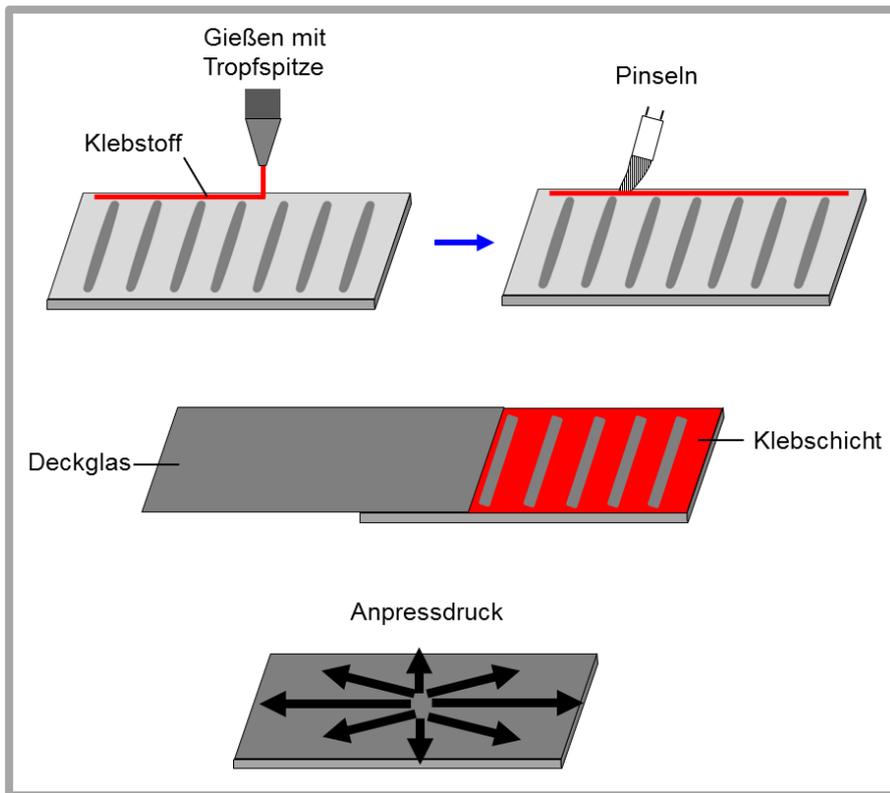


Abb. 7: Auftragsverfahren für Schwanheimer Industriekleber und Schwanheimer Industriekleber Gel.

Loctite AA 3311 und Loctite AA 3494

Loctite AA 3311 ist ein lösungsmittelfreier Einkomponenten-Cyanacrylat-Klebstoff und besteht aus folgenden Komponenten: Isobornylacrylat, N,N-Dimethylacrylamid und Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid. Er ist transparent und niedrigviskös. Dieser Kleber wird vom Hersteller für die medizintechnische Anwendung empfohlen.

Loctite AA 3494 ist ebenfalls ein lösungsmittelfreier Einkomponenten-Cyanacrylat-Klebstoff und besteht aus folgenden Komponenten: 2-Hydroxyethylmethacrylat, Acrylsäure, Hydroxypropylmethacrylat und Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinoxid. Er ist transparent und mittelviskös.

Die Aushärtung beider Klebstoffe erfolgt durch Bestrahlung mit UV-Licht im Wellenlängenbereich von 220 bis 260nm.

Anwendung

Da Loctite AA 3311 und Loctite AA 3494 in einer Kartusche angeboten wird, ermöglicht dies eine saubere und exakte Verarbeitung.

Beide Klebstoffe wurden jeweils auf dem Polycarbonatkörper mittels Kartusche und eines Pinsels dünn und gleichmäßig aufgetragen (Abb. 8). Danach wurde das Deckglas vorsichtig

auf den Polycarbonatkörper fixiert. Eine nachträgliche Korrektur der Verklebung war bei beiden Klebern möglich.

Die Aushärtung der beiden Klebstoffe erfolgte durch UV-Strahlung im Bereich von 260nm und einer Bestrahlungsdauer von 2 min (Abb. 8). Voll belastbar waren die Verklebungen nach 24h.

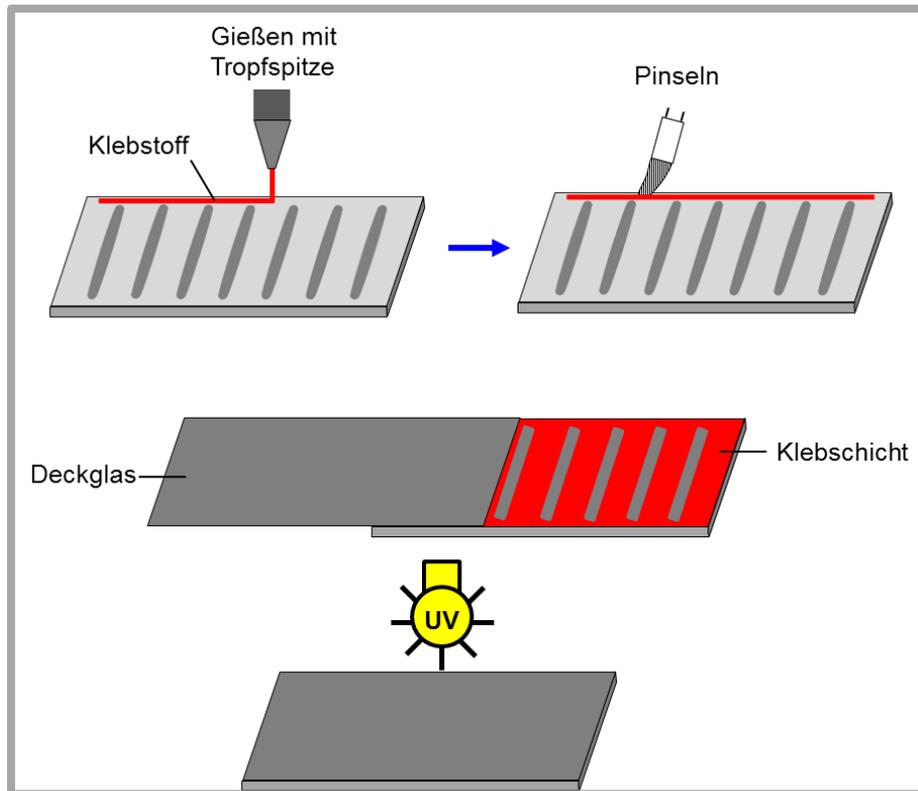


Abb. 8: Auftragsverfahren für Loctite AA 3311 und Loctite AA 3494.

3.2.6 Clot-Polymerisation unter Flow-Bedingungen im Leitschienen-Modell

In den Leitschienen-Modellen wurde die Übertragbarkeit der Ausrichtungsmethoden unter Flow-Bedingungen, die in den 2-Well-Zellkulturkammern entwickelt wurden, überprüft.

Für diese Versuche wurde für die Clot-Polymerisation Plasmaclots mit einem Ausgangsvolumen von 300µl Clotgemisch / Kanal eingesetzt.

Die Clot-Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur für 90 min unter folgenden verschiedenen Versuchsbedingungen:

- statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation)
- unter Flow-Bedingungen auf einem Wippschüttler (50 - 80 rpm)
- auf einem Horizontalschüttler (80 - 120 rpm).

3.2.7 Clot-Polymerisation im elektrischen Feld im Leitschienen-Modell

3.2.7.1 Herstellung des Leitschienen-Modells

Dieses Leitschienen-Modell wurde speziell für die Clotpolymerisation im elektrischen Feld entwickelt und berücksichtigte hierbei ebenfalls die Füllgeometrie einer kommerziell erhältlichen Nervenleitschiene.

Das Modell wurde aus einem Acrylglaskörper (Länge: 74 mm; Breite: 24 mm; Höhe: 6 mm) mit einer eingefrästen Kammer hergestellt (Abb. 9A und B). Anschließend wurde auf die Unterseite des Acrylglaskörpers ein kommerziell erhältliches Deckglas mit Loctite AA 3494 aufgeklebt.

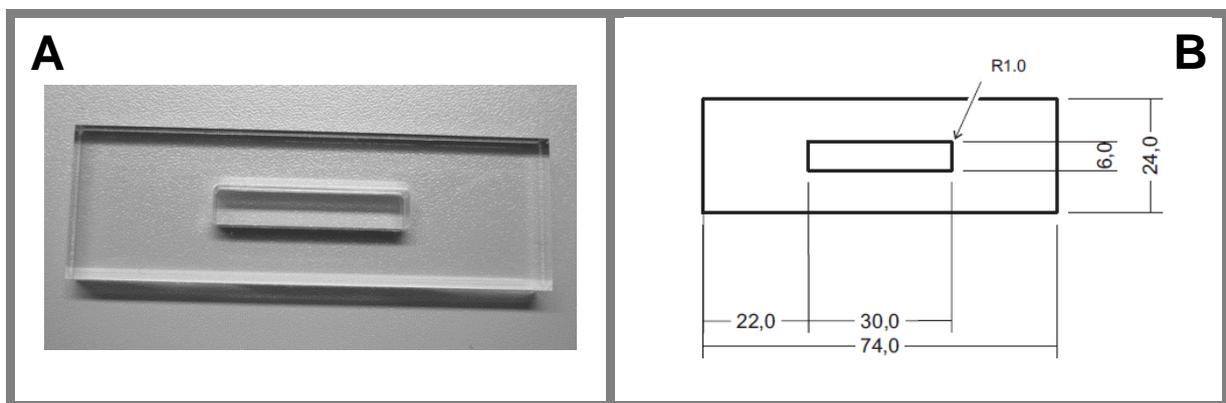


Abb. 9: Selbst entwickeltes Leitschienen-Modell (A) und Skizze (B).

3.2.7.2 Wahl der Elektroden

Als wichtigste Voraussetzung für den Einsatz in einer Plasmaclot-Matrix mit eingebetteten Zellen sollte das verwendete Elektrodenmaterial inert und biokompatibel sein. Daher wurden nur Elektroden aus Platin und Gold eingesetzt. Diese Elektrodenmaterialien haben eine gute elektrische Leitfähigkeit, gehören zu den biokompatiblen Metallen und haben daher keine toxische Wirkung auf Zellen. Sie sind bekanntermaßen gegenüber Blutplasma sehr korrosionsbeständig.

Zur Auswahl einer geeigneten Elektrode wurden folgende Elektrodentypen, die sich in Material und Form unterscheiden, verwendet:

Typ 1: Wiederverwendbare subdermale EEG Nadelelektroden aus Platin L = 10 mm,
Ø 0,3 mm

Typ 2: Kreisförmige Elektrodenplatten: Genuine Grass Ø 10 mm Gold Cup-Disc Electrode.

Für die unterschiedlichen Elektrodentypen wurden passende Elektrodenhalter aus Polymethylmethacrylat (PMMA, Acrylglas) für jeweils zwei Elektroden hergestellt (Abb. 10 B

und 11C). Durch diese Halterung mit integrierten Elektroden wurde eine präzisierte und störungsfreie Messung gewährleistet. Der elektrisch aktive Elektrodenbereich befand sich hierbei zwischen den beiden Elektroden die an den Plus- bzw. Minuspol angeschlossen wurden.

EEG-Platin-Nadelelektroden (Typ 1): Hierbei handelte es sich um massive Nadeln aus Platin mit einem Durchmesser von 0,30 x 10 mm. In Abb. 10A ist der Grundaufbau einer EEG-Platin-Nadelelektrode dargestellt. Abbildung 10B zeigt den selbst angefertigten Elektrodenhalter aus Acrylglas mit Nadelelektroden für die Testmessungen. Der Abstand zwischen den Elektroden betrug hier 20 mm.

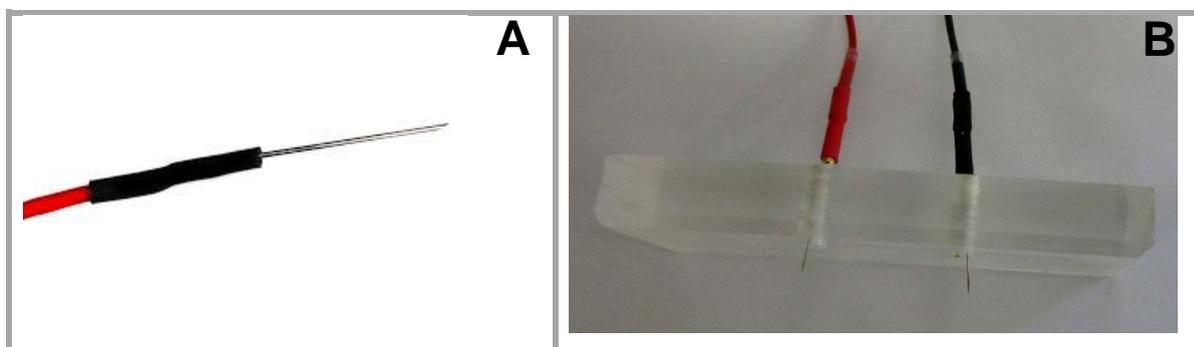


Abb 10A: EEG-Platin-Nadelelektroden (Typ 1). B: Elektrodenhalter mit integrierten EEG-Platin-Nadelelektroden für Testmessungen.

Kreisförmige Elektrodenplatte (Typ 2): Aufgrund ihrer kreisförmigen Form (\varnothing 10 mm) besaßen die Gold-Elektrodenplatten eine stark vergrößerte Elektrodenoberfläche gegenüber den EEG-Platin-Nadelelektroden (Typ 1) (Abb. 11A). Zur Befestigung in den Elektrodenhalter wurden die Elektrodenplatten zusammengerollt (Abb. 11B und C). Der Abstand zwischen den Elektroden betrug 20 mm.

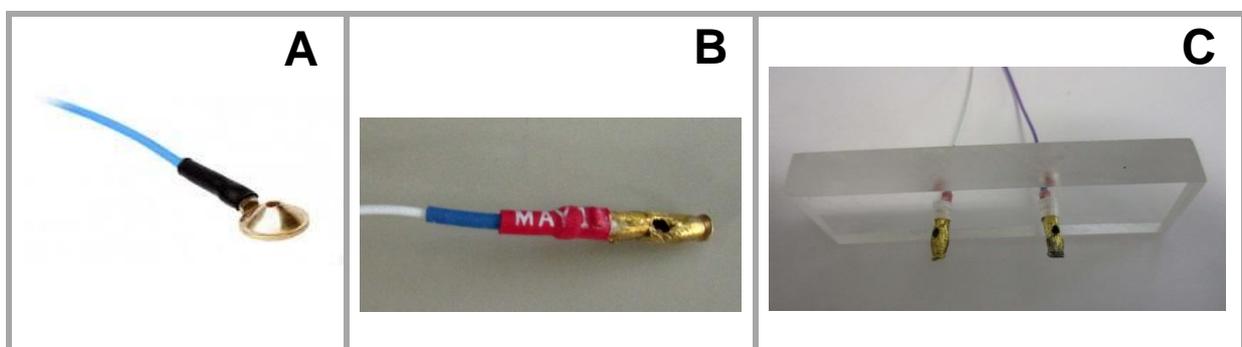


Abb 11A: Gold Cup-Disc Electrode (Typ 2). B: Eingerollte Gold-Elektrodenplatte. C: Elektrodenhalter mit eingerollten Gold-Elektrodenplatten für Testmessungen.

3.2.7.3 Impedanz-Messungen

Zur Bestimmung der Probenleitfähigkeit wurden Impedanz-Messungen durchgeführt, da die Grenzflächen Elektrode / Probe bei Anlegen eines elektrischen Feldes einen entscheidenden Einfluss auf die elektrische Charakteristik des Systems haben.

Die Impedanz-Messung erfolgte immer mit zwei gleichen metallischen Elektroden. Für die Arbeits- und Gegenelektrode wurde daher immer der gleiche Elektrodentyp eingesetzt. Der Abstand zwischen Arbeits- und Gegenelektrode wurde mit Hilfe des Elektrodenhalters konstant bei 20 mm gehalten. Beide Elektroden wurden jeweils am oberen bzw. unteren Ende 5 mm vom inneren Rand der Testkammer entfernt positioniert (Abb. 12). Da die Elektroden über ein Kabel mit einem 1,5mm Sicherheitsstecker verfügten, konnten Krokodilklemmen angeschlossen werden, um so die Verbindung zum Impedanz-Messgerät herzustellen. Als Messlösungen wurden physiologische NaCl-Lösung, Plasma (100%) sowie Plasmaverdünnungen (50%, 75%) mit / ohne Zugabe von CaCl_2 verwendet.

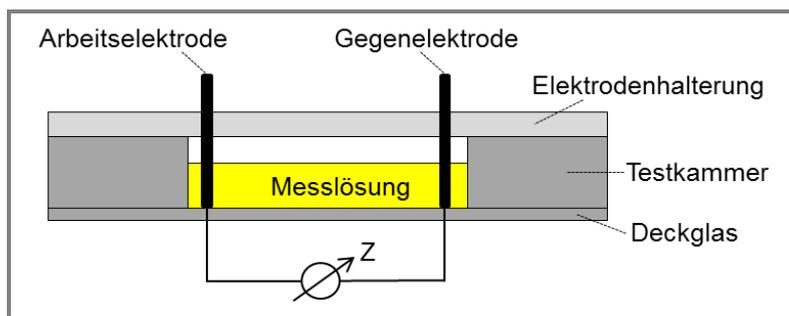


Abb. 12: Darstellung der Elektrodenpositionierung für die Impedanzmessungen.

Die Impedanz-Messungen wurden mit dem HP 4276A LCZ Meter (Hewlett-Packard) durchgeführt und von dem Messprogramm VEE (Systemsoftware) angesteuert und ausgewertet (Abb. 13A und B). Es wurde jede Sekunde der Betrag der Impedanz Z sowie der Phasenwinkel φ aufgezeichnet. Dies ermöglichte eine elektrische Charakterisierung sowohl von den eingesetzten Elektroden als auch von den leitfähigen Komponenten im Plasma. Untersucht wurden die Impedanzen bei einer festen Frequenz von 200 Hz und einem Bias von 20 V über einen Zeitraum von 1h. Die messtechnische Überprüfung des Verhaltens der unterschiedlichen Elektroden erfolgte hierbei ausschließlich mittels zellfreier Tests.

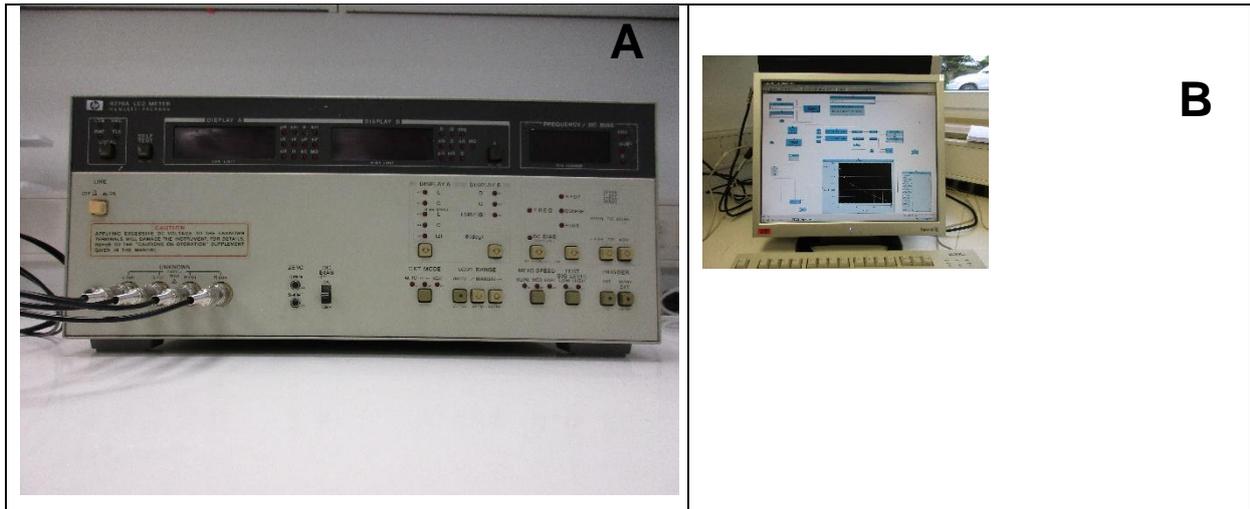


Abb. 13A: HP 4276A LCZ Meter mit einem großen variablen Frequenzbereich von 100 Hz - 20 kHz, Bias bis ± 200 V sowie einem Impedanzbereich von 100 mOhm – 1 mOhm mit 4-stelliger Auflösung.

B: Mit Hilfe der VEE-Messsoftware erfolgte die komplexe Systemsteuerung, Datenaufzeichnung und Datenspeicherung. Die aktuellen Messwerte wurden hier während der gesamten Messung angezeigt und zusätzlich graphisch dargestellt. Die Datenauswertung erfolgte mit den Programmen Excel und Statistica.

3.2.7.4 Clot-Polymerisation im elektrischen Feld mittels Gleichstrom

Für die Clot-Polymerisation im elektrischen Feld mittels Gleichstrom im Einkammersystem wurde das Labornetzgerät PeakTech Dc Power Supply 6080 (Ausgangsstrom: 0 bis 3A DC / Ausgangsleistung: 45 W) in Kombination mit dem BBC Goerz Metrawatt MA 5D Digital Multimeter Messgerät verwendet (Abb. 14B und C).

Für die Clot-Polymerisation wurden Plasmaclots mit einem Ausgangsvolumen von 600 μ l Clotgemisch / Kammer eingesetzt und zur Polymerisationsinitiierung der Clots 5% Calcium zum Clotgemisch zugegeben.

Folgende Prozessparameter wurden getestet:

- statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation)
- elektrisches Feld (Einstellungen Labornetzteil: Gleichstrom 10 mA)

Abbildung 14A zeigt die Anordnung der Elektroden in der Testkammer sowie den gesamten Versuchsaufbau.

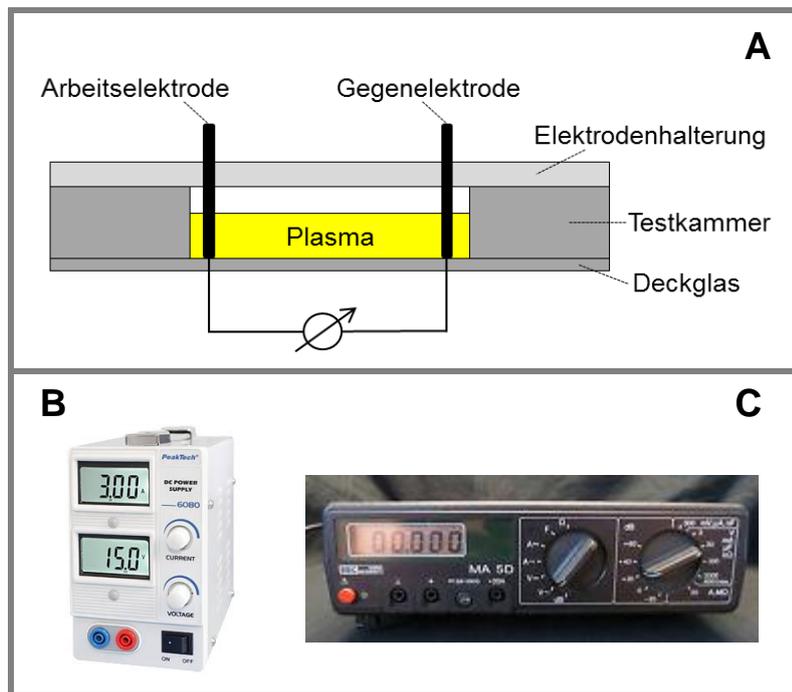


Abb. 14A: Schema des Versuchsaufbaus.

B: Labornetzgerät PeakTech Dc Power Supply 6080 (Ausgangsstrom: 0 – 3A DC / Ausgangsleistung: 45 W).

C: BBC Goerz Metrawatt MA 5D Digital Multimeter Messgerät.

3.2.7.5 Clot-Polymerisation im elektrischen Feld mittels Hochspannung

Die Clot-Polymerisation im elektrischen Feld mittels Hochspannung erfolgte in der selbst gebauten Hochspannungskammer mit integriertem Plus- und Minuspol (Abb. 15F), die in der Hochspannungsschutzkammer (Abb. 15A) platziert wurde (Abb. 15B). Für die erforderliche Hochspannung wurde das Labor-Hochspannungsnetzteil HNCS35000-5 (Heinzinger) eingesetzt (Abb. 15B). Zur Optimierung der Prozessparameter wurde auch hier für alle Versuche das selbst gebaute Nervenleitschienen-Modell (Einkammersystem) verwendet. An beiden gegenüber-liegenden Außenseiten der Kammern wurden Kupferstreifen (4mm) im Abstand von 3mm von der Außenkante und anschließend isolierende Tesafilm-Streifen geklebt. Hierbei wurden 5mm vom Kupferstreifen nicht isoliert (siehe Abb. 15C - E). Um einen elektrischen Kontakt herzustellen, wurden die fixierten Kupferstreifen mit dem Pluspol bzw. Minuspol der Hochspannungskammer verbunden (Abb. 15F).

Für die Clot-Polymerisation wurden Plasmaclots mit einem Ausgangsvolumen von 600µl Clotgemisch / Kammer eingesetzt und zur Polymerisationsinitiierung der Clots 5% Calcium zum Clotgemisch zugegeben. Folgende Prozessparameter wurden getestet:

- statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation)
- elektrisches Feld (Einstellungen Hochspannungsnetzteil: Strom 0,1 mA / Spannung 6,5 KV)

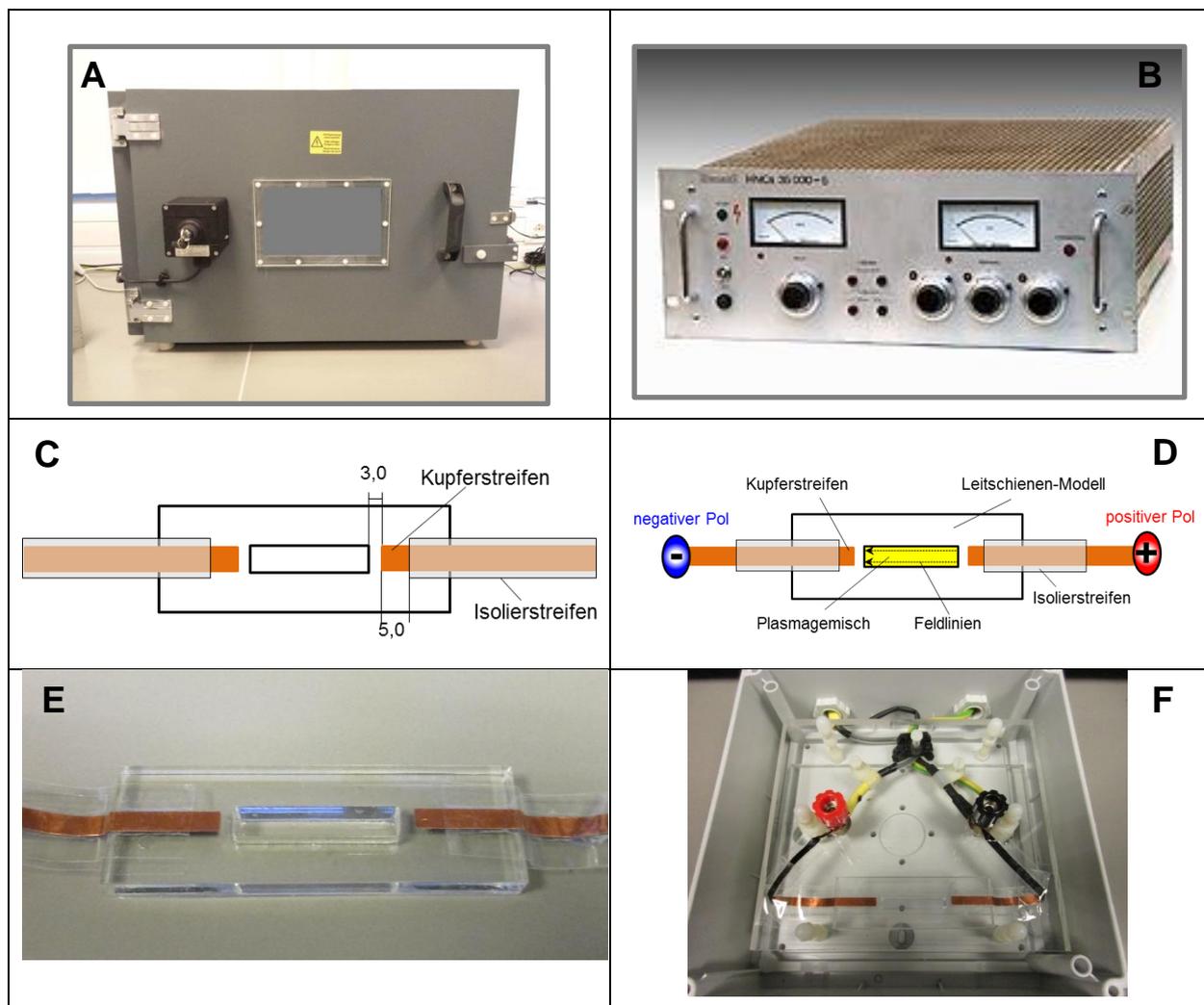


Abb. 15: Versuchsaufbau für die Clot-Polymerisation im elektrischen Feld (Hochspannung).

A: Hochspannungsschutzkammer. B: Hochspannungsnetzteil. C: Leitschienen-Modell mit aufgeklebten Kupferstreifen und Isolierstreifen (Skizze). D: Experimentalschema für die Clot-Polymerisation im elektrischen Feld. Die Richtung der elektrischen Feldlinien, gekennzeichnet durch Pfeile, verläuft von Plus nach Minus. E: Photographie eines Leitschienen-Modells mit aufgeklebten Kupferstreifen und Isolierstreifen. F: Hochspannungskammer mit integriertem Plus- und Minuspol. Elektrischer Kontakt: Verbindung der Kupferstreifen mit Plus- und Minuspol.

Das Prinzip dieser Hochspannungsversuche beruht auf dem Phänomen der sogenannten Korona-Entladung. Eine Korona ist ein Prozess, bei dem ein geringer Stromfluss durch Luft zwischen zwei Elektroden erzeugt werden kann, der meist im Mikroampere-Bereich liegt. Als Ladungsträger wirken dabei Ionen, die in einem Raumgebiet ausreichend hoher Feldstärke durch Feldemission um mindestens eine der Elektroden erzeugt werden [Küchler 2005].

Die Korona-Entladung tritt auf, wenn die elektrische Feldstärke einen bestimmten Wert überschreitet, aber noch nicht hoch genug ist, um eine Funkenentladung hervorzurufen.

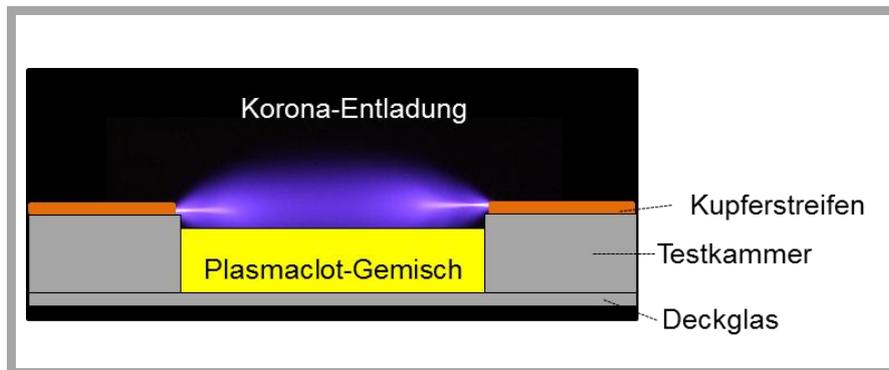


Abb. 16: Schematische Darstellung des Korona-Entladungsprinzips. Die Korona-Entladung ist ein unvollständiger Funkendurchbruch in einem stark inhomogenen Feld, in diesem Versuch an den Enden der Kupferstreifen. Die Korona-Entladung erzeugt dabei einen Stromfluss durch die Luft zwischen den beiden Kupferstreifen, die mit dem Plus- und Minuspol verbunden sind. Bei der ebenen Oberfläche des Plasmaclot-Gemischs treten dabei fast homogene elektrische Feldstärken und eine über die Fläche fast gleichmäßige Entladung auf.

3.2.8 Rasterelektronenmikroskopische Analyse

Um die Auswirkungen des Plasmaanteils (50% und 75%) in Kombination mit den unterschiedlichen Ausrichtungsmethoden auf die Plasmaclot-Architektur (Fibrinfasern) detektieren zu können, wurden die Clots mittels Rasterelektronenmikroskopie analysiert.

Probenaufarbeitung:

Die Plasmaclots wurden vorsichtig mit einem Skalpell aus den 2-Well-Zellkulturkammern herausgelöst, zweimal in PBS gewaschen und danach in 5%igem Glutaraldehyd (verdünnt in PBS) für 24h bei 4°C im Kühlschrank fixiert. Im folgenden Schritt wurden die Clots in Aqua dest. gewaschen und in aufsteigender Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% und 100%) dehydriert. Anschließend wurden die Proben in einen Netz-Probenhalter transferiert und bis zum Einbau in den Critical-Point-Trockner (K850, EMITECH) in 100%igem Ethanol belassen. Das Prinzip dieses Trocknungssystems beruht auf dem Austausch des 100%igen Ethanols aus den Proben durch flüssiges CO₂ bei niedriger Temperatur, welches dann unter Druck erwärmt und verdampft wird. Durch den Übergang des CO₂ von der flüssigen in die gasförmige Phase wurde den Plasmaclots jegliche Feuchtigkeit entzogen.

Im folgenden Schritt wurden die getrockneten Clots mit leitfähigen Klebetabs auf gestielte Aluminium-Probenteller fixiert und abschließend mit einer Gold-Palladium-Schicht von 12,5 nm Dicke besputtert. Alle rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden am

DSM 962 (Zeiss) durchgeführt. Von jedem Clot entstanden mehrere Aufnahmen mit 3000-facher Vergrößerung.

In den resultierenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die mittlere Clot-Faserdicke aus einer Vielzahl an Messungen ermittelt. Hierfür wurde zunächst eine Maske mit fünf definierten Flächen ($10\mu\text{m}^2$) an fixierten Positionen erstellt, die auf jede REM-Aufnahme gelegt wurde (Abb. 17). Die Dicke von 10 unterschiedlichen Fibrinfasern wurde in jeder Fläche (50 Fasern / REM-Aufnahme) mit Hilfe der Software ImageJ 1.37 (National Institute of Health, USA) gemessen.

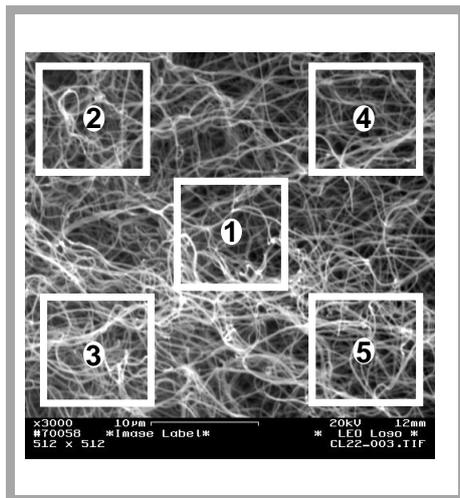


Abb. 17: Für die Messung der Clot-Faserdicken wurde eine Maske mit fünf definierten Flächen an fixierten Positionen digital auf jede REM-Aufnahme gelegt.

3.2.9 Analyse der Fibrinfaserausrichtung mittels Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)

Die entstandenen Fibrinfaserausrichtungen wurden ebenfalls mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM 700, Zeiss) analysiert. Zur Beurteilung der Faserausrichtung mittels konfokaler Lasermikroskopie wurden die Plasmaclots zusätzlich mit 0,1%igem humanen Fibrinogen (Alexa Fluor 594 konjugiert, Invitrogen) markiert. Dieses Konjugat wurde während der Clotpolymerisation in die Fibrinfasern eingebaut und konnte dadurch zur Anfärbung der Fibrinfasern eingesetzt werden.

Desweiteren wurden das Wachstumsverhalten und die Zellorientierung von eingebetteten Stammzellen an den gerichteten Fibrinfasern nach Calcein-AM-Färbung untersucht.

3.2.10 Analyse der Fibrinfaserausrichtung mittels Fast Fourier Transformation (FFT)

Die resultierenden REM bzw. Laser-Scanning-Bilder wurden mit der Fast Fourier Transformation (FFT) ausgewertet. Die FFT ist ein mathematischer Algorithmus zur computergestützten Frequenzanalyse mit dessen Hilfe die REM- bzw. Laser-Scanning-Bilder in den so genannten Frequenz-Raum überführt werden können, in dem nicht mehr die Grauwerte selbst, sondern die Frequenz- und Phasenanteile der zugrunde liegenden Pixelfolge gespeichert werden. Da die FFT und die Umwandlung in Frequenzspektren auf

einem Algorithmus aus Sinus- und Cosinus-Funktionen beruhen, resultieren aus Bildern mit sich wiederholenden Strukturanordnungen besonders auffällige Frequenzspektren (Abb. 18).

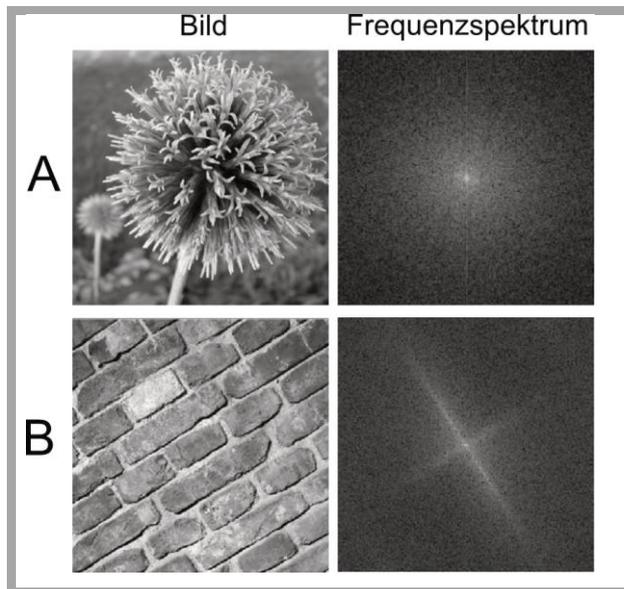


Abb. 18: FFT-Beispiele für zwei unterschiedliche Bilder vor und nach Transformation.

A: Die Blume besitzt viele gleichartige Blüten, die aber in keiner einheitlichen Richtung angeordnet sind. Das Frequenzspektrum zeigt daher eine radiale, gleichmäßige Verteilung.

B: Die Ziegelsteine sind auf eine ähnliche Art und Weise angeordnet und folgen derselben Richtung. Das Frequenzspektrum zeigt eine deutlich erkennbare Linie.

Abbildung 18 zeigt anhand einfacher Beispiele, dass mit der FFT bestimmte Eigenschaften wie z.B. Strukturausrichtungen besser hervorgehoben werden können. Die FFT eignet sich somit zur Bildanalyse und Mustererkennung und damit zur quantitativen Analyse der Faserausrichtung in REM- bzw. LSM-Bildern.

Für die Bildbearbeitung und FFT-Analyse wurde die Software ImageJ 1.44 (U.S. National Institutes of Health) mit dem „Oval Profile Plug-in“ (William O’Connel) verwendet.

Vor der FFT-Analyse wurden die Bilder konvertiert (8-Bit Grauwert TIF-File) und auf 2048 x 2048 Pixel eingestellt. Zur Reduzierung des Hintergrundrauschens wurde anschließend der Hintergrund vom Bild subtrahiert und der Kontrast verstärkt (Graustufenwert: 256). Danach wurden die Bilder mit dem Median-Filter gefiltert. Abschließend erfolgte die FFT der Bilder, um das Frequenzspektrum zu erzeugen (Abb. 19B). Abbildung 19B zeigt das resultierende FFT-Bild von Abbildung 19A. Bereiche des Originalbildes mit starken Kontrasten stehen für hohe Frequenzen in der Bildmitte, großflächige Bereiche mit weichen Übergängen für niedrigere Frequenzen im Außenbereich. Die Grauwert-Pixel sind in einem charakteristischen Muster verteilt, die den Grad der Fibrinfaserausrichtung des Originalbildes widerspiegeln.

Die Grauwert-Pixel des Frequenzspektrums, die den jeweiligen Bildpunkten des Bildes zugeordnet sind, wurden bei dem FFT-Prozess allerdings um 90° gedreht. Um diese Drehung zu kompensieren, wurde das Frequenzspektrum wiederum um 90° gedreht (Abb. 19C).

Für die quantitative Auswertung wurde anschließend eine elliptische Auswahl um das Zentrum des Frequenzspektrums gesetzt (Abb. 19D). Über das Oval-Profile-Plug-In von ImageJ wurden mittels radialer Summierung von 1 bis 360° die Helligkeitsintensitäten der Grauwerte vom Zentrum bis zur Peripherie der Auswahl addiert. Die Intensitätssummen wurden zu relativen Werten im Bereich von 0 bis 1 normalisiert, mit der höchsten Intensitätssumme als Maximum (= 1 = 100 %) und Bezugswert. Die relativen Werte wurden weiterhin graphisch dargestellt (Abb. 19E und F). Dabei wurden nur die Werte im Bereich von 1 bis 180° näher betrachtet, da sie exakt den Werten des Bereiches von 181 bis 360° entsprechen, weil die untere Bildhälfte des Frequenzspektrums eine Spiegelung der oberen Bildhälfte darstellt.

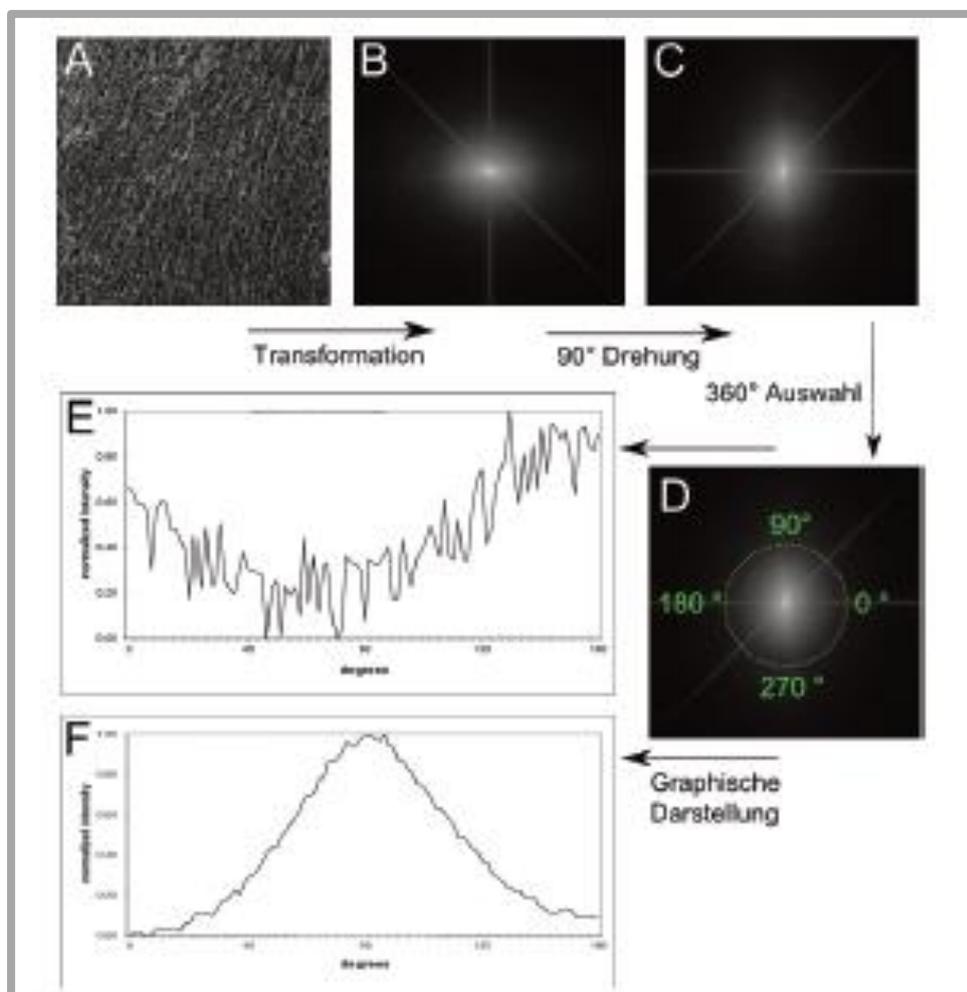


Abb. 19: FFT-Analyse eines Plasmaclots. A: Grauwert-LSM-Bild eines Plasmaclots. B: Frequenzspektrum des Plasmaclot-Bildes. C: Rotation des Frequenzspektrums um 90°. D: Kreisförmige Auswahl um das Zentrum des Frequenzspektrums mit positionbezogener Winkelangabe. E: Graphische Darstellung der FFT-Analyse eines Plasmaclots ohne gerichtete Fasern. F: Graphische Darstellung der FFT-Analyse eines Plasmaclots mit gerichteten Fasern.

Anhand des Graphen konnte darauf geschlossen werden, ob es sich bei den analysierten Fasern um ungerichtete oder gerichtete Fasern handelte. Bei ungerichteten Fasern ergab

sich ein Graph ohne bestimmte Richtung oder Form (Abb. 19E und 20A). Bei gerichteten Fasern war dagegen ein deutlicher Peak erkennbar (Abb. 19F und 20B).

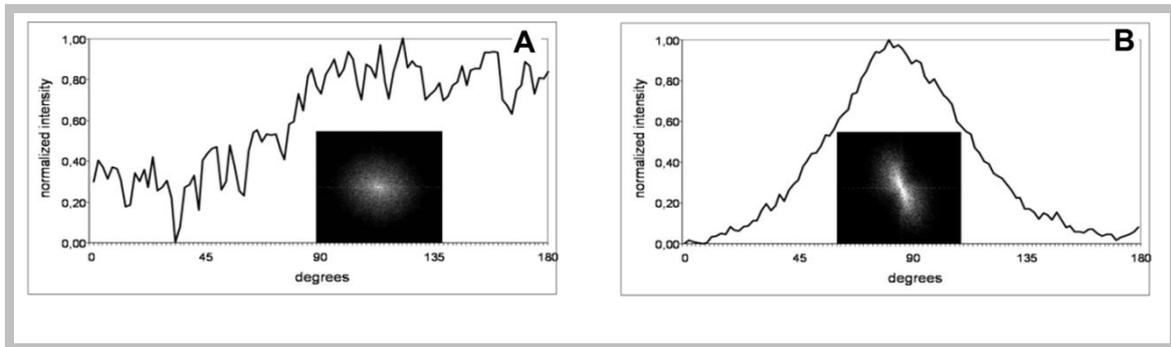


Abb. 20: FFT-Analyse eines Plasmaclots mit ungerichteten Fasern (A) und mit gerichteten Fasern (B).

Die Faserausrichtung der Plasmaclots wurde durch die Höhe und Form der Peaks wiedergegeben und konnte über die Berechnung der Halbwertsbreite (*Full Width at Half Maximum*, FWHM) der Peaks sowie über die Peakflächen (*Peak Area* X_{\min} to X_{\max}) quantifiziert werden (Abb. 21).

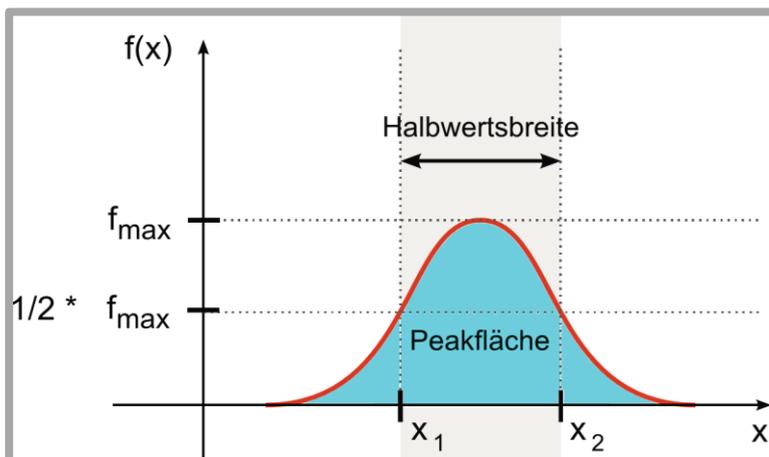


Abb. 21: Definition der Halbwertsbreite und der Peakfläche. Die Halbwertsbreite ist die Breite des Peaks ($x_2 - x_1$) auf halber Höhe ($1/2 * f_{\max}$) des Peakmaximums (f_{\max}). Die Peakfläche (blau) ist die Fläche zwischen der Kontur des Peaks (rot) und der Basislinie des Peaks (hier: x-Achse).

Ergänzend wurde ein Alignment Index nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Alignment Index} = \frac{\delta / (\Delta + \delta)}{\delta_{\text{IR}} / (\Delta + \delta)_{\text{IR}}}$$

δ (Summe der Frequenzen innerhalb 20° vom Peak Knickwinkel)

$(\Delta + \delta)$ (Gesamtsumme aller Frequenzen)

$\delta_{\text{IR}} / (\Delta + \delta)_{\text{IR}}$ (stichprobenartige Häufigkeitsverteilung).

3.2.11 Statistische Analyse der Fibrinfaserausrichtung und der Fibrinfaserdicke

Die durch die FFT ermittelten Halbwertsbreiten und Peakflächen sowie die gemessenen Fibrinfaserdicken wurden mit der Software Statistica 10 (StatSoft) zunächst mit Methoden der explorativen Datenanalyse untersucht und deskriptiv ausgewertet. Insbesondere Mittelwerte und Standardabweichungen wurden hierbei ermittelt. Im Rahmen der explorativen Analyse erfolgte die Überprüfung auf Homogenität der Gruppen und die Prüfung der Verteilungen auf Normalität.

Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurden nicht-parametrische Testverfahren zur Darstellung und Auswertung der Ergebnisse angewendet. Zum Mehrgruppenvergleich wurde als Vortest der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Bei Signifikanz wurde anschließend zum Vergleich von jeweils zwei Gruppen der Mann-Whitney-U-Test gewählt.

3.2.12 Einfluss der unterschiedlichen Fibrinmatrices auf mesenchymale bzw. neuronale Stammzellen

In dieser Studie wurden humane neuronale Stammzellen der Linie H9 (Invitrogen) und humane mesenchymale Stammzellen (Lonza) verwendet.

3.2.12.1 Zellkultur H9-Zellen

Für die adhärente Zellkultur der H9-Zellen wurden T75-Zellkulturflächen (BD FALCON) mit Poly-L-Ornithin / Laminin beschichtet.

Im ersten Schritt erfolgte die Beschichtung mit 6ml Poly-L-Ornithin-Lösung (100µg/ml) über Nacht bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurde eine zweite Beschichtung mit 6ml Laminin-Lösung (10µg/ml) aufgetragen. Abschließend wurden die Kulturflaschen nach einer Inkubation über Nacht bei 4° C erneut zweimal mit DPBS gespült. Die Flaschen wurden entweder direkt für die Zellkultivierung genutzt oder mit 10 ml DPBS überschichtet und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Als Kulturmedium wurde Knockout DMEM-F12 (Invitrogen) eingesetzt, dem 2% (v/v) *Neural Supplement* hinzugefügt wurde. Weitere Bestandteile waren 1 % GlutaMAX (entspricht 2 mM L-Glutamin) sowie jeweils 20ng/ml b-FGF und EGF. Das Medium wurde vor der Verwendung stets auf 37 °C vorgewärmt.

Beim Erreichen einer Konfluenz von annähernd 90% erfolgte die Passage auf neue beschichtete Kulturflaschen. Nach Absaugen des Expansionsmediums wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und für 3 min bei 37°C im Brutschrank in 6 ml vorgewärmter Accutase (Invitrogen) inkubiert. Der Grad der Zellablösung von der Kulturflaschenoberfläche wurde unter einem inversen Lichtmikroskop (Olympus) kontrolliert. Die Zellsuspension wurde

in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen (BD FALCON) transferiert, in dem 8ml Zellkulturmedium vorgelegt worden waren. Danach folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 200 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1ml angewärmtem Medium resuspendiert. Nach Zellzählung mittels einer Neubauer Zählkammer wurden die H9-Zellen in einer Dichte von 40.000/cm² auf eine beschichtete Zellkulturflasche in 15ml Expansionsmedium ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.2.12.2 Zellkultur MSC

Die Kultivierung der MSC erfolgte in unbeschichteten T75-Zellkulturflaschen als adhärent wachsende Zellschicht. Als Zellkulturmedium wurde RPMI1640 (Invitrogen) unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom) eingesetzt.

Beim Erreichen einer Konfluenz von annähernd 90% wurden die MSC passagiert. Dazu wurde das Expansionsmedium entfernt, die adhärennten Zellen zweimal mit jeweils 10ml DPBS gewaschen und anschließend für 3 min bei 37°C im Brutschrank in 6ml Trypsin (0,05%) / EDTA (Invitrogen) inkubiert. Der Grad der Zellablösung von der Kulturflaschenoberfläche wurde unter einem inversen Lichtmikroskop (Olympus) kontrolliert. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen mit 8ml Zellkulturmedium transferiert. Danach folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 200 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Zellzählung mittels einer Neubauer Zählkammer wurden die MSC in einer Dichte von 4.000/cm² auf eine beschichtete Zellkulturflasche in 15ml Expansionsmedium ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.2.13 Analyse der Zellviabilität, der –proliferation und –orientierung mittels Laser-Scanning-Mikroskopie

Um die Auswirkungen des Plasmaanteils (50% und 75%) in Kombination mit den unterschiedlichen Ausrichtungsmethoden auf das Wachstumsverhalten und die Zellorientierung der Stammzellen detektieren zu können, wurden vor der Clotpolymerisation Stammzellen zum Clotgemisch zugegeben. Die Plasmaclots enthielten 5 x 10⁵/ml neuronale Stammzellen bzw. 5 x 10⁴/ml mesenchymale Stammzellen. Nach der Clotkoagulation unter den unterschiedlichen Polymerisationsbedingungen wurden die Clots mit Zellkulturmedium überschichtet und für 24h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach folgte eine Anfärbung der Zellen mit Calcein-AM. Das Prinzip dieser Färbung wird in Abb. 22 dargestellt.

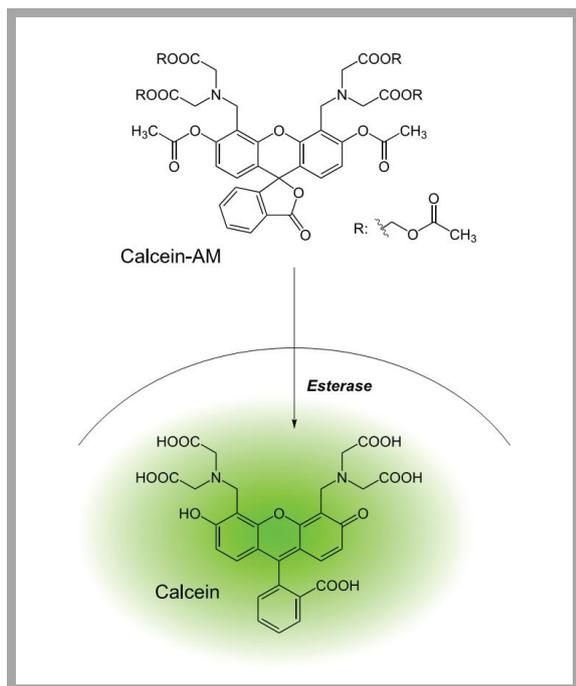


Abb. 22: Funktionsprinzip der Calcein-AM-Färbung. Das nicht fluoreszierende Calcein-AM ist aufgrund des Amoxymethylanteils in der Lage, Zellwände zu durchdringen und wird im Zytoplasma durch die Aktivität einer zytoplasmatischen Esterase zu fluoreszierendem Calcein umgewandelt. Diese Esterase ist nur in lebenden Zellen vorhanden. Fluoreszierendes Calcein reichert sich im Zytoplasma vitaler Zellen an und ist an einer gleichmäßigen grünen Fluoreszenz erkennbar (Excitation: 494 nm; Emission: 517 nm).

Für die Calcein-AM-Färbung wurden die Plasmaclots zweimal mit RPMI gewaschen, danach mit Calcein-AM-Lösung (16µg/ml in RPMI) überschichtet und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Clots zweimal mit RPMI gewaschen und zur Analyse unter dem Laser-Scanning-Mikroskop in RPMI belassen.

3.2.14 Chemotaxis-Assays

3.2.14.1 Gezielte Beeinflussung der Zellmigration durch neurotrophe Faktoren

Zur Testung des Migrationsverhaltens humaner neuronaler Stammzellen (H9) bzw. humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) auf verschiedene Substanzen, deren migrationsfördernde Eigenschaften untersucht werden sollten, wurden das kommerziell erhältliche Zweikammersystem HTS Fluoroblok (BD, Heidelberg) und ein selbst entwickeltes Migrationsmodell verwendet. Anhand des Zweikammersystems konnten Aussagen über die Quantität der migrierten Zellen und die Dynamik der Zellmigration getroffen werden. Die Ergebnisse des Chemotaxis-Assays mit dem Zweikammersystem gaben dabei einen ersten Überblick über die effektivsten Substanzen, die dann im Migrationsmodell eingesetzt wurden. Bei den Chemotaxis-Experimenten im Migrationsmodell standen dagegen die Sensitivität der Zellen gegenüber verschiedenen Konzentrationsgradienten, Zellbewegungsmuster und Veränderung der Zellmorphologie in der Clot-Matrix im Vordergrund.

3.2.14.2 Chemotaxis Assay mit HTS FluoroBlok Zellkultureinsätzen

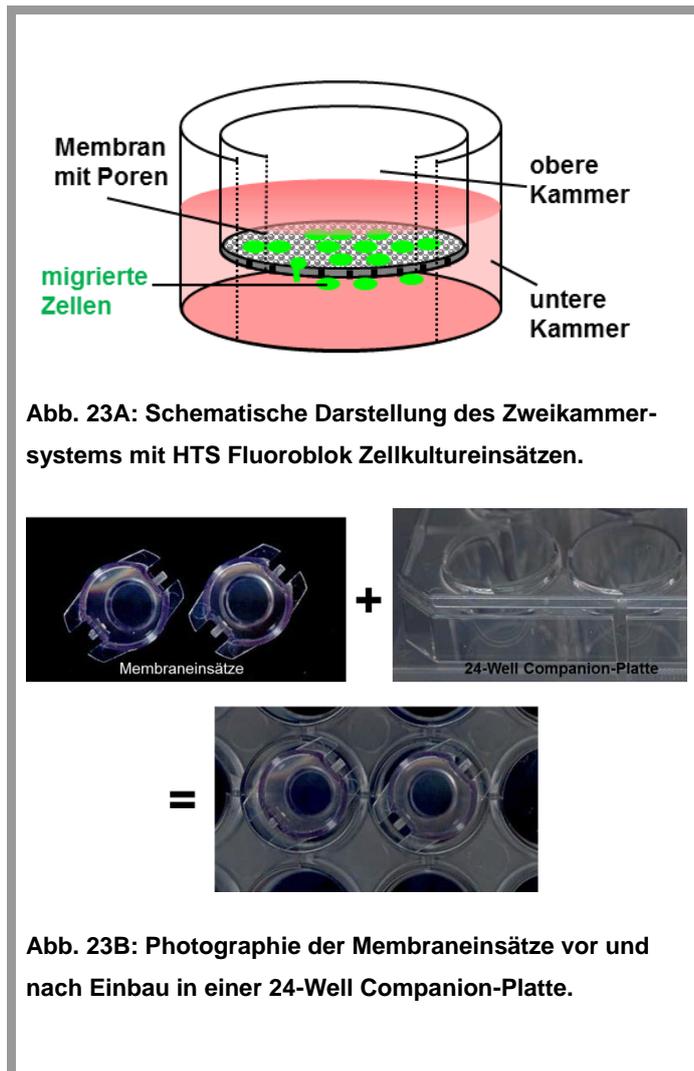
Zur Analyse des chemotaktischen Potentials verschiedener neurotropher Faktoren wurde der Chemotaxis Assay mit BD Falcon 24-Well Companion-Platten und den dazugehörigen BD Falcon HTS FluoroBlok Membraneinsätzen verwendet (Tab. 3).

Tab. 3: Merkmale der BD Falcon HTS FluoroBlok Membraneinsätze für 24-Well Companion-Platten.

	24 Wells
Membrandurchmesser (mm)	6,4
Membranfläche (cm ²)	0,3
Porengröße (µm)	8,0
Porendichte / cm ²	1,0 x 10 ⁵
Insert-Höhe (mm)	17,5
Distanz zwischen Membran und Wellboden (mm)	0,8
Empfohlenes Mediumvolumen in Insert (ml)	0,2 – 0,35
Empfohlenes Mediumvolumen in Well (ml)	0,7 – 0,9

Mit Hilfe dieses Zweikammersystems wurden H9-Zellen bzw. hMSC von der zu untersuchenden potentiell-chemotaktischen Substanz durch eine lichtundurchlässige PET-Membran, die Licht mit einer Wellenlänge von 490-700nm ausfiltert, getrennt. Die Porengröße (8µm) dieser PET-Membran wurde dabei so gewählt, dass darauf liegende Zellen sie nur durch aktive Migration überwinden konnten. Zur Ermittlung der effektivsten Faktorkonzentration wurden die unteren Kammern mit einer steigenden Faktor-Konzentration (10ng/ml, 20ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml) befüllt.

Der Aufbau dieses Zweikammersystems ist in Abb. 23A schematisch sowie in Abb. 23B der Einbau der einzelnen Membraneinsätze in die 24-Well Companion-Platte photographisch dargestellt.



Zellen, die durch die Membranporen durchgewandert waren, ließen sich nach Calcein-AM-Färbung auf der Unterseite der Membran mikroskopisch nachweisen und quantifizieren.

Ausgewertet wurde bei diesem Chemotaxis-Assay allein die Zellzahl auf der Unterseite der Membran. Desweiteren wurde folgender Chemotaxis-Index (CI) berechnet:

$$CI = \frac{\text{Zellzahl der migrierten Zellen (Faktor)} - \text{Zellzahl der migrierten Zellen (Kon)}}{\text{Zellzahl der migrierten Zellen (Kon)}}$$

Vorteil dieses Assays war, dass mit Hilfe dieses einfachen Screening-systems Faktoren, die eine hohe chemotaktische Wirkung auf H9-Zellen bzw. hMSC haben, identifiziert werden konnten.

Die optimale Faktorkonzentration, die optimale Zellkonzentration sowie die optimale Reaktionszeit konnten ebenfalls mit dem Assay festgelegt werden.

Eine Analyse der Migrationsgeschwindigkeit oder von Veränderungen der Zellmorphologie war bei dieser Methode jedoch nicht möglich.

Für die Untersuchung des chemotaktischen Effekts auf H9-Zellen wurden folgende neurotrophe Faktoren in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt:

- NGF-beta (Nerve Growth Factor beta)
- BDNF (Brain Derived neurotrophic Factor)
- NT-3 (Neurotrophin-3)
- IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1)
- FGF-9 (Fibroblast Growth Factor 9)
- GDNF (Glial-derived Neurotrophic Factor)
- SDF-1 (Human Stromal-Cell Derived Factor-1)
- CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor)
- PDGF-BB (Platelet-derived Growth Factor BB)
- VEGF α (Vascular-endothelial Growth Factor- α)
- EGF (Epidermal Growth Factor)

Zur Analyse des chemotaktischen Effekts auf MSC wurden folgende Faktoren verwendet:

- HGF (Hepatocyte Growth Factor)
- PDGF-BB (Platelet-derived Growth Factor BB)
- FGF-9 (Fibroblast Growth Factor 9)
- IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1)
- EGF (Epidermal Growth Factor)
- VEGF α (Vascular-endothelial Growth Factor- α)
- SDF-1 (Human Stromal-Cell Derived)

Die Chemotaxisexperimente wurden jeweils an die spezifischen Erfordernisse der H9-Zellen bzw. MSC und des Botenstoffsystems angepasst.

3.2.14.3 Durchführung FluoroBlok-Chemotaxis Assay mit H9-Zellen

Beschichtung der Membran-Inserts

Um die Zelladhäsion zu ermöglichen, wurden die Membran-Inserts mit Laminin / 0,5% BSA beschichtet. Dafür wurden die Inserte in Laminin / 0,5% BSA über Nacht bei 4°C eingelegt, mit sterilem DPBS gewaschen und bis zum Gebrauch in DPBS belassen.

Kurzstimulation der H9-Zellen mit BDNF

Vor der Durchführung des Chemotaxis-Assays wurde zur Aktivierung der H9-Zellen eine Kurzstimulation mit BDNF durchgeführt. Hierzu wurden die in Knockout-Medium resuspendierten Zellen nach Zugabe von BDNF (100ng/ml) für 1h bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit DPBS gewaschen.

Durchführung Chemotaxis Assay

Die unteren, 750 μ l fassenden Kompartimente des Chemotaxis-Systems wurden mit Knockout Medium / 0,5% BSA (Kontrollansatz) oder mit Knockout Medium / 0,5% BSA in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen der chemotaktischen Substanzen gefüllt. Danach wurden die beschichteten Inserte aufgesetzt. Anschließend wurden 3×10^5 stimulierte Zellen in 300 μ l Knockout Medium / 0,5% BSA in jedes Membran-Insert gegeben. Die Zellen wurden für 48h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.14.4 Durchführung FluoroBlok-Chemotaxis Assay mit MSC

Die unteren Kompartimente des Chemotaxis-Systems wurden jeweils mit 750 μ l Knockout Medium / 0,5% BSA (Kontrollansatz) oder Knockout Medium / 0,5% BSA in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen der chemotaktischen Substanzen versetzt. Danach

wurden unbeschichtete Inserts aufgesetzt. Anschließend wurden 2×10^4 MSC in $300\mu\text{l}$ Knockout Medium / 0,5% BSA in jedes Membran-Insert gegeben und für 48h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.14.5 FluoroBlok-Chemotaxis Assay mit Kokultur von MSC und H9-Zellen

Um die Zellmigration von H9-Zellen zu induzieren, wurden in weiteren Versuchen anstelle von rekombinanten Chemokinen MSC direkt als Chemokindonoren eingesetzt. Für die Chemotaxis-Versuche wurden jeweils 2×10^4 hMSC pro 1 ml RPMI / 10% FCS in die unteren Kompartimente ausgesät und zum Anwachsen der Zellen für 24h vorinkubiert. Direkt vor Zugabe der H9-Zellen erfolgte ein Mediumwechsel mit Knockout Medium / 0,5% BSA bzw. mit RPMI / 10% FCS. Danach wurden beschichtete Inserts aufgesetzt. Anschließend wurden 3×10^5 mit BDNF stimulierte H9-Zellen in $300\mu\text{l}$ Knockout Medium / 0,5% BSA in jedes Membran-Insert gegeben (Abb. 24). Die Zellen wurden für 48h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

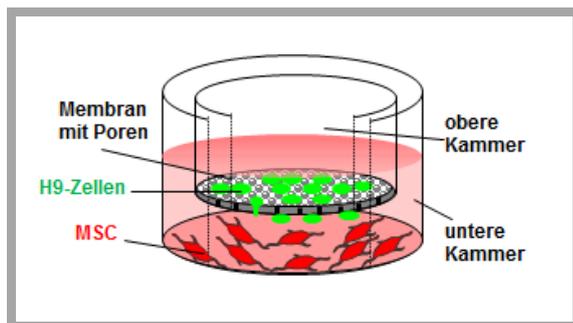


Abb. 24: Schematische Darstellung der Kokultur von MSC (rot) und H9-Zellen (grün) im Zweikammersystem mit HTS FluoroBlok Zellkultureinsätzen.

3.2.14.6 Auswertung des Chemotaxis-Assays mittels Calcein-AM

Nach Beendigung der 48-stündigen Migrationsperiode im Zweikammersystem wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite der Inserts mit Calcein-AM für 30 min gefärbt. Die Bilder der migrierten Zellen wurden an einem Olympus MVX Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines 1,25x-Objektives mit einer digitalen Kamera (F-View, Olympus) und dem dazugehörigen Softwareprogramm CellSence (Olympus) aufgenommen.

Anschließend wurde die Anzahl der migrierten Zellen für jedes einzelne Insert mit dem Softwareprogramm ImageJ bestimmt (Abb. 25).

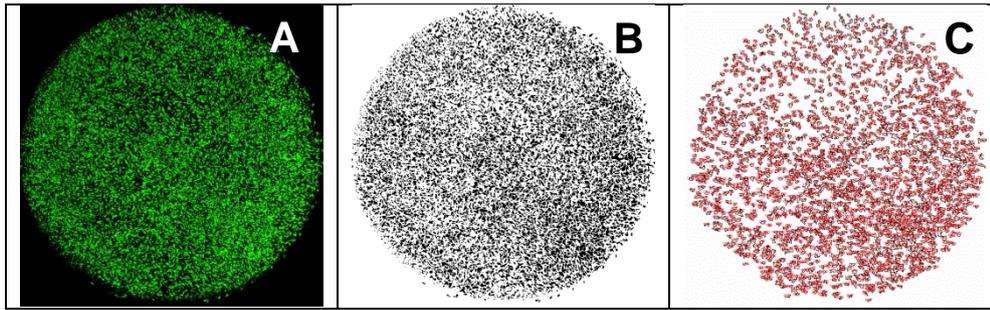


Abb. 25: Zellzählung mittels ImageJ Software. A: Calcein-AM-Färbung der migrierten Zellen auf der Unterseite des Inserts. B: Umwandlung des Farbbildes in SW-Bild (Process: Binary: Make Binary) und Trennung in einzelne Zellen (Process: Binary: Watershed). C: Automatische Zellzählung (Menü: Analyze Particles) nach Eingrenzung der Partikelgröße (Size: 25 – Infinity / Circularity: 0.00 -1.00). Nach Erfassung mit ImageJ wurden die gezählten Zellen rot markiert.

Die Daten mehrerer Kammern mit identischen Ansätzen aus vier unabhängigen Versuchen wurden zusammen statistisch ausgewertet. Die Daten der Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen wurden mit den Computerprogrammen Excel und Statistica generiert.

3.2.14.7 Statistische Auswertung des FluoroBlok-Chemotaxis Assays

Die gewonnenen Daten wurden mit der Software Statistica 10 (StatSoft) zunächst mit Methoden der explorativen Datenanalyse untersucht und deskriptiv ausgewertet. Insbesondere Mittelwerte und Standardabweichungen wurden hierbei ermittelt.

Zur Ermittlung der Signifikanz der Ergebnisse wurden mit dem Software-Programm GraphPad Prism5 die einfaktorische ANOVA (1-Way ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche durchgeführt sowie der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Das Signifikanzniveau wurde hierbei mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

3.2.15 3D-Chemotaxis Assay im selbst entwickelten Migrationsmodell

3.2.15.1 Selbst entwickeltes Migrationsmodell

Das Migrationsmodell wurde speziell für chemotaktische Untersuchungen in einer 3-dimensionalen Plasmaclot-Matrix entwickelt. Dieses Modell berücksichtigte hierbei die Füllgeometrie einer kommerziell erhältlichen Nervenleitschiene und ermöglichte die Analyse von 3-dimensionaler Zellmigration in einer vernetzten Struktur unter Verwendung eines gerichteten bzw. ungerichteten Plasmaclots.

Das Migrationsmodell wurde aus einem Acrylglaskörper (Länge: 74 mm; Breite: 24 mm; Höhe: 6 mm) mit zwei eingefrästen unterschiedlich großen Kammern hergestellt (Abb. 26A und B). Die große Kammer (Clot-Reservoir) wurde von der kleinen Kammer (Chemokin-Reservoir) durch einen Acrylas-Schieber (13 x 13mm) mit integriertem halbkreisförmigem Loch an der Unterseite getrennt (Abb. 26C – D). Damit wurde eine Trennung von

Attraktantquelle und Plasmaclot mit migrierenden Zellen erreicht (Abb. 26E – F). Die Ausbildung des Gradienten aus dem Chemokin-Reservoir heraus erfolgte dann durch das in das Deckglas eingefräste Loch in den Plasmaclot. Durch den geringen Querschnitt des Lochs konnte der Gradient zwischen beiden Kammern lange Zeit konstant gehalten werden.

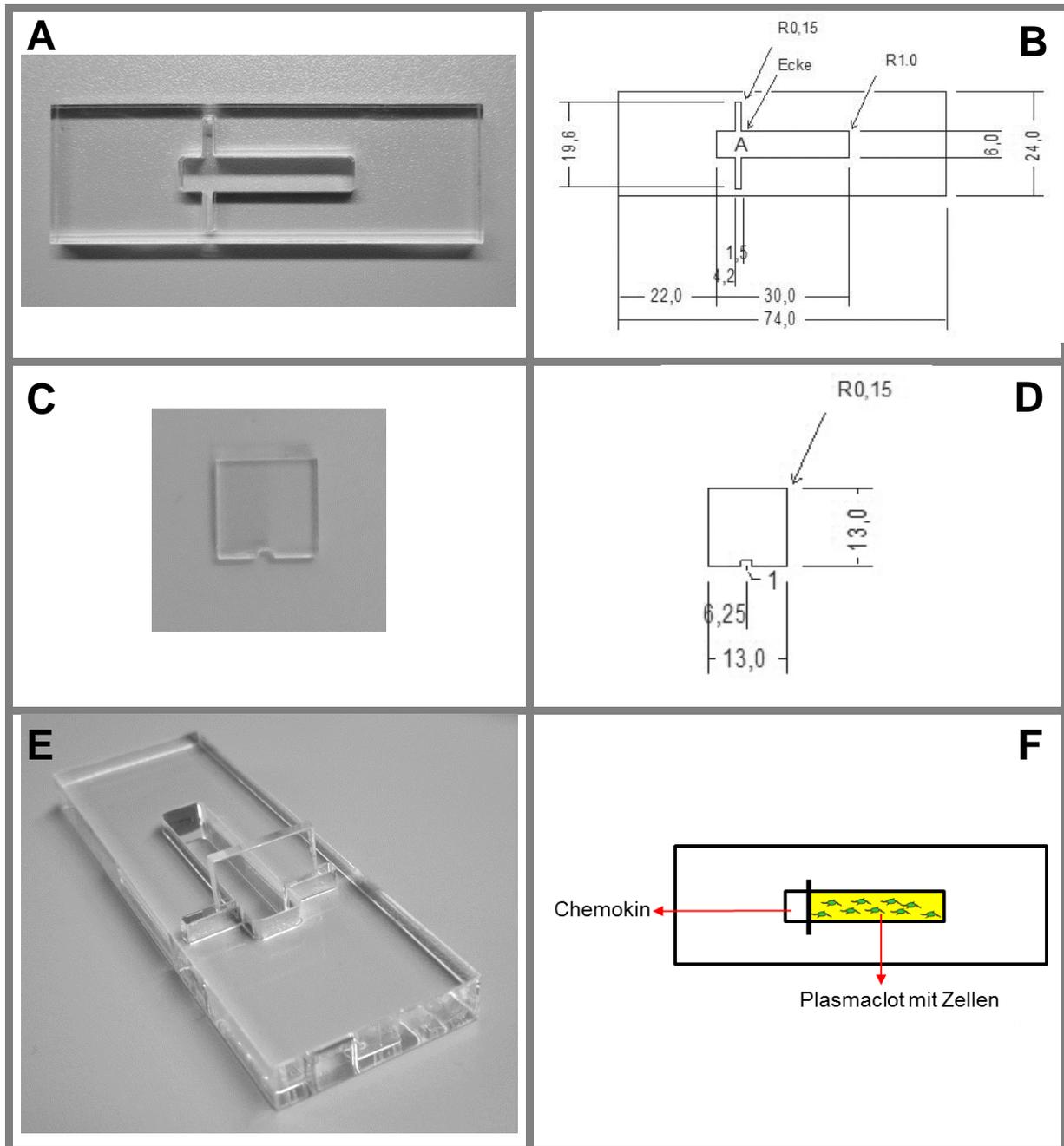


Abb. 26: Selbst entwickeltes Migrationsmodell (A) und Skizze (B). C: Acrylglas-Schieber mit integriertem halbkreisförmigem Loch an der Unterseite mit Skizze (D). E: Zusammengebaute Migrationskammer. F: Skizze zur Darstellung von Chemokin-Reservoir und Clot-Reservoir. Die zu untersuchenden Zellen befanden sich nach der Clot-Polymerisation eingebettet in der Clot-Matrix im Clot-Reservoir.

Zur Verwendung des Migrationsmodells als Migrationskammer für Chemotaxisexperimente wurde ein kommerziell erhältliches Deckglas mit Loctite AA 3494 auf die Unterseite des Acrylglaskörpers aufgeklebt. Nach 48h wurde die Migrationskammer mehrfach mit sterilem Aqua dest. gewaschen und danach getrocknet. Da klassische Sterilisationsverfahren nicht einsetzbar waren, wurden die Kammern für die Chemotaxisversuche mit einer Antibiotikum-Antimykotikum-haltigen Lösung (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin) sterilisiert. Diese Vorgehensweise wurde hierzu entwickelt und erwies sich als am besten praktikabel.

3.2.15.2 Farbstoffexperimente

Um die Funktionalität der entwickelten Migrationsmodelle zu überprüfen, wurden zunächst durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit einem diffundierenden Fluoreszenzfarbstoff eine Analyse der Entwicklung des Diffusionsprofils abhängig von der Versuchsdauer und der verwendeten Plasmaclot-Matrix (gerichtet / ungerichtet) durchgeführt. Zudem sollte untersucht werden, ob die Plasmaclotmatrix möglicherweise eine Diffusionsbarriere erzeugt.

Zur Überprüfung der Ausbreitung des Konzentrationsgradienten wurden Farbstoffexperimente mit FITC-Dextran eingesetzt. Der zur Erhöhung des Molekulargewichtes an Dextran gebundene Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC-Dextran; Sigma-Aldrich, Deutschland) simulierte dabei die Diffusion der Chemokine IL-8 und SDF-1 (Tab. 4).

Tab. 4: Eigenschaften von FITC-Dextran und der dazu korrespondierenden Chemokine IL-8 und SDF-1.

	SDF-1 (Human Stromal-Cell Derived Factor-1)	IL-8 (72aa) (Human Interleukin-8)	FITC-Dextran
Hersteller	Biochrom	Biochrom	Sigma Aldrich
	CXC-Chemokin Peptidkette mit 68 Aminosäuren	CXC-Chemokin Peptidkette mit 72 Aminosäuren	Polymer von Anhydroglukose mit FITC markiert, Anregung/Emission λ_{max} : 490/520 nm
Molmasse [g/mol]	8000	8400	10000
Diffusionskoeffizient D [m ² /s]	$\approx 1 \times 10^{-10}$	$\approx 1 \times 10^{-10}$	$\approx 1 \times 10^{-10}$

Für die Farbstoffexperimente wurde 1mg FITC-Dextran in sterilem Aqua dest. gelöst (c = 100µM) und dann im folgenden Schritt eine 1:100 Verdünnung in RPMI hergestellt (c = 1µM). Von dieser FITC-Dextran-Lösung wurde jeweils 150µl in das Chemokin-Reservoir zugegeben und die Ausbreitung der Diffusionsfront im Plasmaclot mit gerichteten bzw. ungerichteten Fasern mittels Fluoreszenzmikroskopie (MVX, Olympus) und Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM, Zeiss) nach einer Inkubationszeit von 24h analysiert (Abb. 27).

Mit dem MVX-Fluoreszenzmikroskop konnte durch geringe Vergrößerung ($\times 0,63$) ein größeres Objektfeld, das die Abbildung fast des gesamten Leitschienenmodells ermöglichte, betrachtet werden. Durch die Laser-Scanning-Mikroskopie war eine verbesserte Abbildung der Clot-Mikrostrukturen möglich.

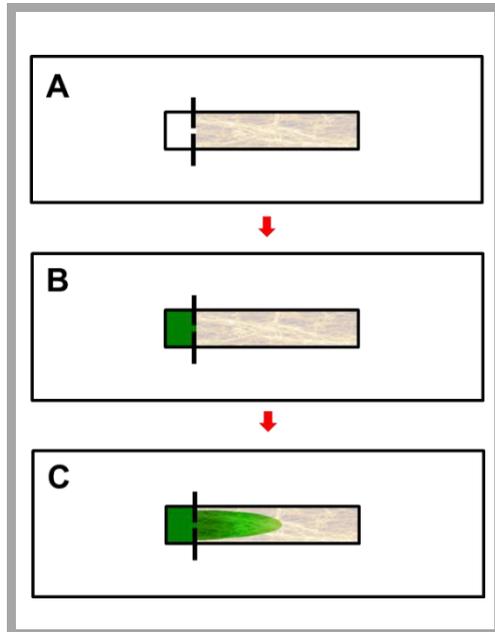


Abb. 27: Ablauf der Farbstoffexperimente.

A: Zugabe 600 μ l Clotgemisch in Clot-Reservoir. Danach Clot-Polymerisation bei Raumtemperatur für 60 min unter folgenden Versuchsbedingungen: statisch (Kontrolle), unter Flow-Bedingungen.

B: Start des Farbstoffexperiments: Zugabe 150 μ l FITC-Dextran-Lösung (grün) in Chemokin-Reservoir

C: Farbstoffausbreitung von FITC-Dextran im Fibrin-Netzwerk des Plasmaclots und anschließende Analyse mittels Fluoreszenz- bzw. Laser-Scanning-Mikroskopie nach 24h.

Zur Auswertung des Diffusionsprofils von FITC-Dextran wurde eine Bildserie, bestehend aus sechs hintereinander folgenden Ausschnitten, mittels Laser-Scanning-Mikroskopie hergestellt.

Um die ortsabhängige Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran im Plasmaclot zu analysieren, wurden anschließend diese 6 Ausschnitte so zusammengefügt, dass die gesamte Detektionszone vom Acrylglasschieber bis zur Mitte des Migrationsmodells in einem Bild dargestellt wurde. Die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean Intensity) wurde danach für jeden einzelnen Abschnitt ausgewertet. In Abbildung 28 ist das Auswerteverfahren beispielhaft dargestellt.

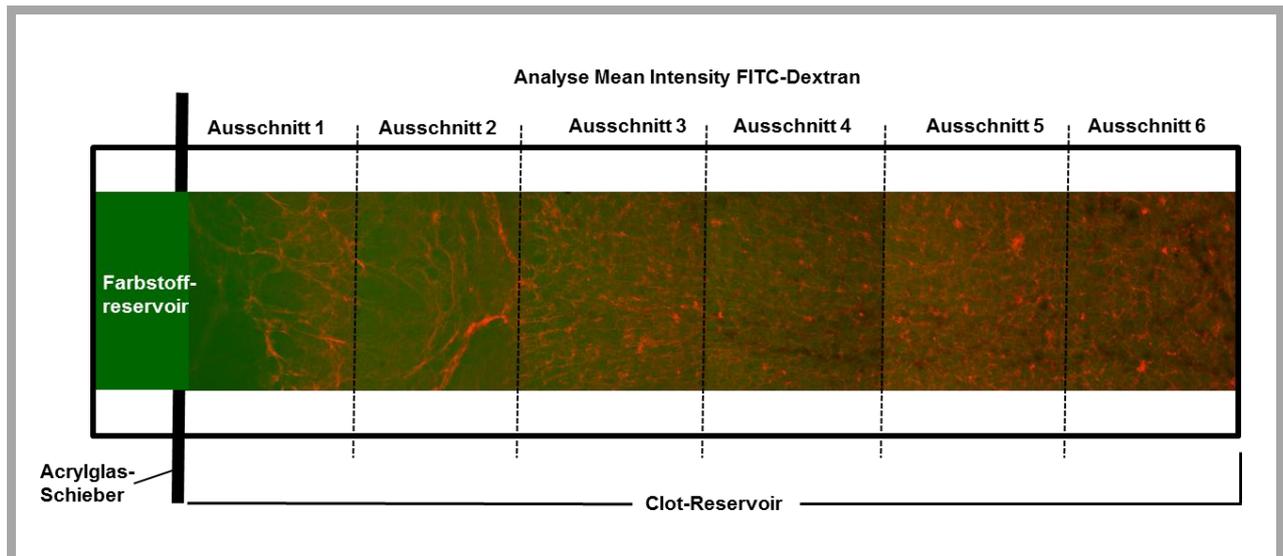


Abb. 28: Auswerteverfahren der Farbstoffexperimente. Um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu gewährleisten, wurde die Bildserie auf die Mitte des halbkreisförmigen Lochs im Acrylglas-Schieber in x-Richtung und die Mitte des Clot-Reservoirs in y-Richtung zentriert.

3.2.15.3 Verwendete Zelllinien

Parallel zu den Farbstoffexperimenten wurden zur Etablierung der 3D-Chemotaxis ausgewählte Zelllinien, stellvertretend für langsam und schnell migrierende Zellen, eingesetzt. Die Geschwindigkeit mit der sich eine Zelle durch eine Fibrinmatrix bewegt, ist im weitesten Sinne umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Um sich zu bewegen, müssen große, langsame Zellen die umgebende Plasmaclot-Matrix unter Verwendung von Proteasen, mit denen die Quervernetzungen der zu durchwandernden Fibrinstrukturen aufgelöst werden können, umformen. Diese Zellen bewegen sich mit einer Geschwindigkeit von etwa $0,5 - 1 \mu\text{m} / \text{min}$ [Even-Ram et al. 2005].

Neutrophile Granulozyten migrieren dagegen zwischen 10- und 40-fach so schnell wie MSC oder H9-Zellen durch eine Gelmatrix. Die Migrationsgeschwindigkeit von Granulozyten liegt bei etwa $24 - 27 \mu\text{m} / \text{min}$ [Foxman et al. 1999]. Aufgrund der geringeren Größe bewegen sich Granulozyten ohne Matrixmodellierung und nur durch morphologische Anpassung durch die Plasmaclot-Matrix [Friedl et al. 2000].

Im Rahmen dieser Studie wurden stellvertretend für langsam migrierende Zellen MSC und H9-Zellen und für schnell migrierende neutrophile Granulozyten für den 3D-Chemotaxis Assay im Migrationsmodell verwendet.

3.2.15.4 Durchführung 3D-Chemotaxis-Assay mit neutrophilen Granulozyten (PMN)

Für die Experimente mit neutrophilen Granulozyten wurde im ersten Schritt ein Plasmaclot-Gemisch mit / ohne IL-8 ($100 \text{ng} / \text{ml}$) hergestellt. Davon wurde jeweils 1 Tropfen von $30 \mu\text{l}$ an ein Ende einer 1-Kanal-Leitschiene pipettiert. Nach Clot-Polymerisation wurden $600 \mu\text{l}$

Plasmaclot-Gemisch in die Leitschiene zugegeben. Die Clot-Polymerisation erfolgte danach bei Raumtemperatur unter folgenden Versuchsbedingungen: statisch, unter Flow auf dem Wippschüttler (60 rpm). Nach Koagulation des zweiten Clots wurden mittels Kanüle 1×10^6 PMN / $10 \mu\text{l}$ RPMI / 10% FCS in die Plasmaclot-Matrix an das andere Ende der Leitschiene injiziert (Abb. 29). Danach wurden die Clots jeweils mit 1ml RPMI / 10% FCS überschichtet und für 24h inkubiert. Abschließend wurden die PMN mit Calcein-AM angefärbt und die Zellmigration mittels Laser-Scanning-Mikroskopie mit dem 5x Objektiv analysiert.

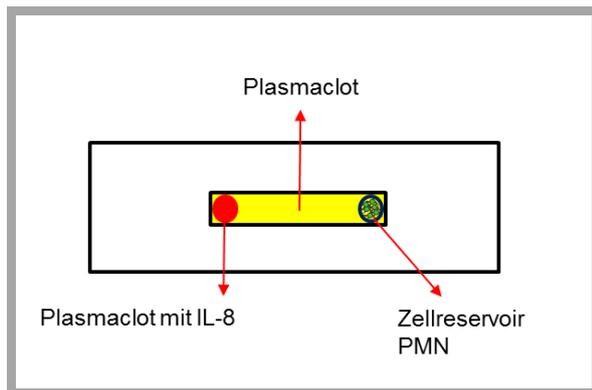


Abb. 29: Ablauf des Chemotaxis-Assays mit PMN.

1. Zugabe 1 Tropfen ($30 \mu\text{l}$) Clotgemisch mit/ohne IL-8 (rot). Danach Clot-Polymerisation bei Raumtemperatur für 60 min.
2. Überschichtung mit $600 \mu\text{l}$ Clotgemisch (gelb) und anschließende Clot-Polymerisation (statisch oder unter Flow) bei Raumtemperatur für 60 min.
3. Injektion 1×10^6 PMN in Clotmatrix (grün).
4. Calcein-AM-Färbung und Mikroskopie nach 24h.

In jeder Leitschiene wurde jeweils eine Bildserie horizontal zwischen IL-8-Clot und dem PMN-Reservoir hergestellt. Um die Zellmigration im Plasmaclot in Richtung Chemokin zu analysieren, wurden anschließend diese 4 Ausschnitte zu einem Bild zusammengefügt und der prozentuale Anteil der Zellen, die eindeutig in Richtung IL-8-Clot wanderten, berechnet. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde hierbei für jeden einzelnen Abschnitt mit dem Software-Programm ImageJ ausgewertet.

3.2.15.5 Durchführung 3D-Chemotaxis-Assay mit MSC und H9-Zellen

Zur Chemotaxis-Analyse wurden $600 \mu\text{l}$ der jeweiligen Zellen, suspendiert im Plasmaclot-Gemisch, in das Clot-Reservoir des Migrationsmodells gefüllt. Dabei wurde bei H9-Zellen eine Zellzahl von 1×10^6 / $600 \mu\text{l}$ und bei MSC eine Zellzahl von 2×10^4 / $600 \mu\text{l}$ eingesetzt. Die Clot-Polymerisation erfolgte danach bei Raumtemperatur unter folgenden Versuchsbedingungen: statisch, unter Flow unter Flow auf dem Wippschüttler (60 rpm).

Direkt nach der Clot-Polymerisation wurden $150 \mu\text{l}$ Chemokin in das Chemokin-Reservoir gegeben, was gleichzeitig den Chemotaxis-Assay in dem Migrationsmodell startete und die Ausbildung des Chemokingradienten initiierte. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit chemoattraktant-freiem Medium durchgeführt (Abb. 30).

Der Plasmaclot mit eingebetteten Zellen wurde anschließend mit 1ml Knockout Medium / 0,5% BSA überschichtet, um ein Austrocknen der Zell-Matrix zu vermeiden.

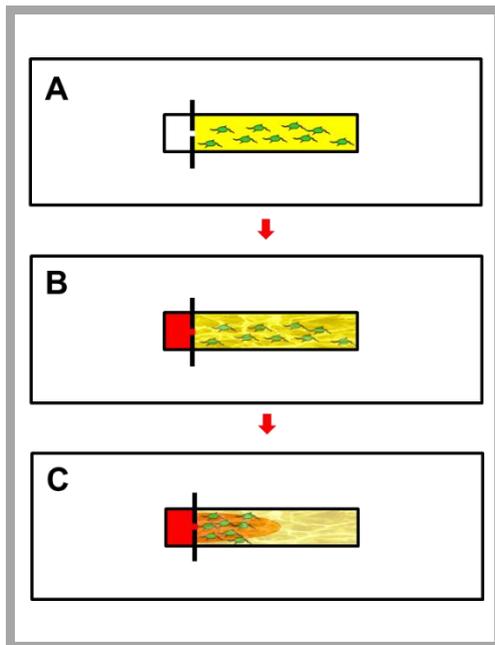


Abb. 30: Ablauf des 3D-Chemotaxis-Assays in den Migrationsmodellen.

A: Zugabe 600µl Clot / Zellgemisch in Clot-Reservoir. Danach Clot-Polymerisation bei Raumtemperatur für 60 min unter folgenden Versuchsbedingungen: statisch (Kontrolle) und unter Flow-Bedingungen.

B: Start des Chemotaxis-Assays: Zugabe 150µl Chemokin (rot) in Chemokin-Reservoir.

C: Chemokinausbreitung im Fibrin-Netzwerk des Plasmaclots und anschließende Analyse der Zellmigration nach Calcein-AM-Färbung mittels Laser-Scanning-Mikroskopie nach 48h.

Nach einer Inkubationsdauer von 48h wurden die Zellen mit Calcein-AM angefärbt und die Zellmigration mittels Laser-Scanning-Mikroskopie mit dem 5x Objektiv analysiert. In jedem Migrationsmodell wurde jeweils eine Bildserie, bestehend aus vier hintereinander folgenden Abschnitten, direkt am Acrylglas-Schieber hergestellt. Um die Zellmigration im Plasmaclot in Richtung Chemokin zu analysieren, wurden anschließend diese 4 Ausschnitte so zusammengefügt, dass die gesamte Detektionszone am Acrylglas-Schieber entlang in einem Bild dargestellt wurde. Anschließend wurde die Anzahl der migrierten Zellen für jeden einzelnen Abschnitt mit dem Software-Programm ImageJ ausgewertet. In Abbildung 31 ist das Auswerteverfahren beispielhaft dargestellt.

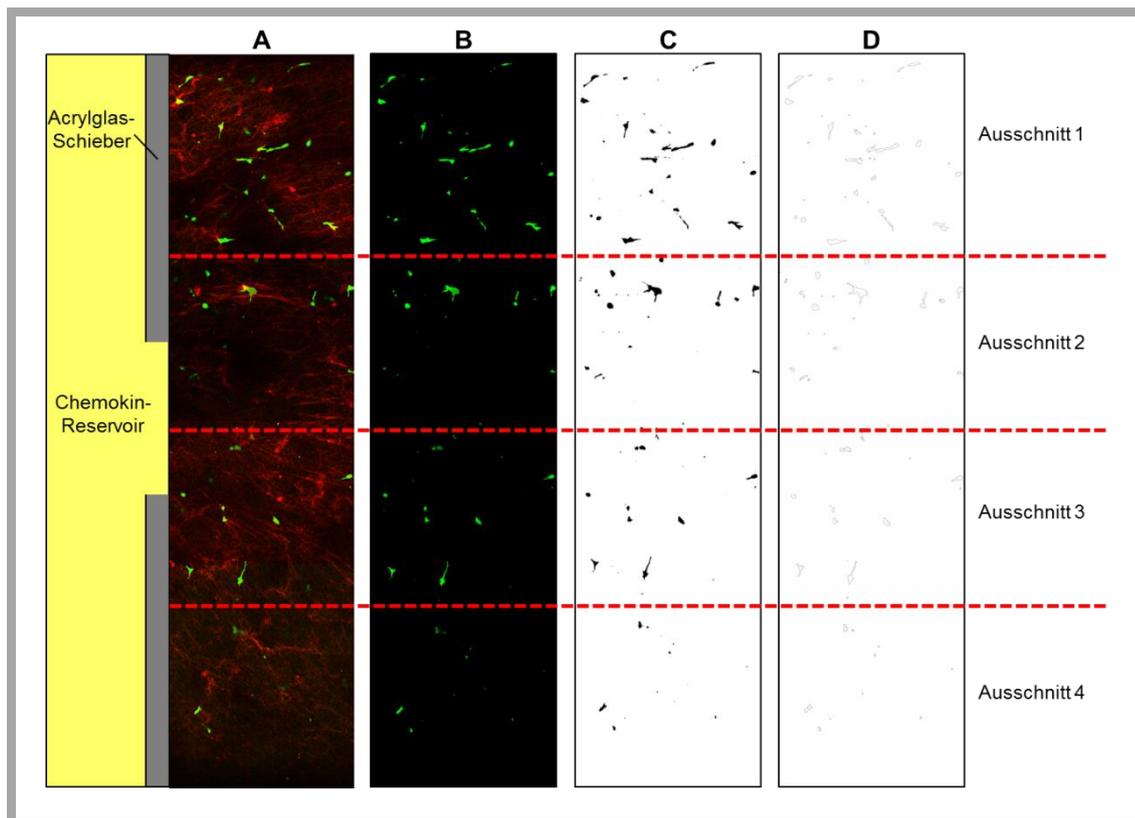


Abb. 31: Auswerteverfahren der 3D-Chemotaxis-Assays in den Migrationsmodellen.

A: Bildserie mittels 5x-Objektiv, bestehend aus vier hintereinander folgenden Abschnitten direkt am Acrylglas-Schieber. Die einzelnen Bilder wurden dabei als Mehrkanalbilder aufgenommen (Kanal 1 (grün): Zellen mit Calcein-AM gefärbt. Kanal 2 (rot): Fibrinfasern markiert mit Alexa Fluor 594 konjugiertem Fibrinogen).

B: Kanaltrennung: Darstellung der Zellen nur in Kanal 1. **C:** Umwandlung des Farbbildes in SW-Bild mittels ImageJ-Software (Threshold setzen), binäre Kodierung (Process: Binary: Make Binary) und Trennung in einzelne Zellen (Process: Binary: Watershed). **D:** Automatische Zellzählung (Menü: Analyze Particles) nach Eingrenzung der Partikelgröße (Size: 25 – Infinity / Circularity: 0.00 -1.00).

Die Daten mehrerer Migrationskammern mit identischen Ansätzen aus drei unabhängigen Versuchen wurden zusammen statistisch ausgewertet. Die Daten der Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen wurden mit den Computerprogrammen Excel und Statistica generiert.

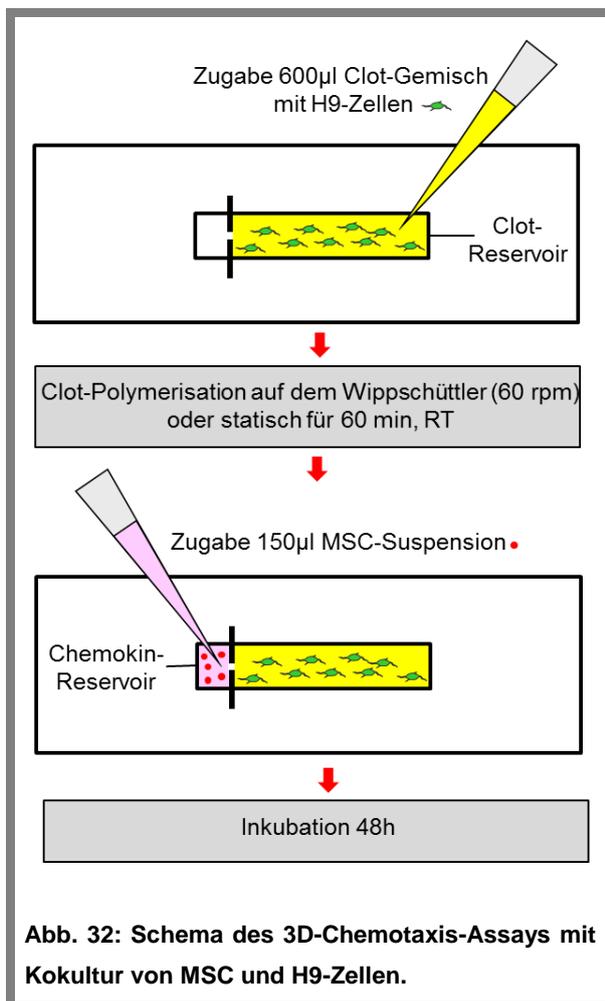
3.2.15.6 Statistische Auswertung des 3D-Chemotaxis-Assays mit MSC und H9-Zellen im Migrationsmodell

Die gewonnenen Daten wurden mit der Software Statistica 10 (StatSoft) mit Methoden der explorativen Datenanalyse untersucht und deskriptiv ausgewertet. Insbesondere Mittelwerte und Standardabweichungen wurden hierbei ermittelt.

Zur Ermittlung der Signifikanz der Ergebnisse wurden mit dem Software-Programm GraphPad Prism5 die einfaktorielle ANOVA (1-Way ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche durchgeführt (Signifikanzniveau: $p \leq 0,05$).

3.2.15.7 Durchführung des 3D-Chemotaxis-Assays mit Kokultur von MSC und H9-Zellen

Um die Zellmigration von H9-Zellen zu induzieren, wurden analog zum FluoroBlok-Chemotaxis Assay (Kapitel: 3.2.13.5) anstelle von rekombinanten Chemokinen MSC direkt als Chemokinquelle eingesetzt.



Für die Chemotaxis-Versuche wurden jeweils 600µl Clot-Gemisch mit 1×10^5 H9-Zellen in die Clot-Reservoirs der Migrationskammern gegeben. Anschließend erfolgte die Clot-Polymerisation unter Flow auf dem Wippschüttler (60 rpm) oder statisch für 60 min bei Raumtemperatur. Nach erfolgter Clot-Koagulation wurden jeweils 1×10^4 MSC in 150µl RPMI / 10% FCS bzw. bei den Kontrollansätzen 150µl RPMI / 10% FCS ohne Zellen in das Chemokin-Reservoir pipettiert. Danach wurden die Plasmaclots mit Zellkulturmedium vorsichtig überschichtet (Abb. 32). Nach einer Inkubationsdauer von 48h wurden die Zellen mit Calcein-AM angefärbt und die Zellmigration mittels Laser-Scanning-Mikroskopie mit dem 5x Objektiv analysiert.

3.2.16 Kultivierung von H9-Zellen in Kokultur mit MSC im Plasmaclot

Interaktionen zwischen MSC und H9-Zellen im Plasmaclot wurden zusätzlich in 4-Well-Zellkulturkammern (Sarstedt) analysiert. Um MSC von H9-Zellen zu unterscheiden, wurden MSC zusätzlich mit fluoreszierenden Nanopartikeln (Qtracker 565, Invitrogen) nach Herstellerangaben für 1h bei 37°C markiert. Diese Qtracker-Nanopartikel wurden von den

MSC aufgenommen und reichert sich im Zytoplasma an. Sie ermöglichen durch eine intensive und stabile gelb-grüne Fluoreszenzmarkierung die Detektion der markierten Zellen im Plasmaclot. Qtracker 565-Nanopartikel wurden bei einer Extinktion von 405-525nm angeregt und emittierten Licht einer Wellenlänge von 565nm

Für die Kokultur-Experimente wurden jeweils 500µl Clot-Gemisch mit $2,5 \times 10^4$ H9-Zellen und $12,5 \times 10^4$ markierten MSC in Wells einer 4-Well-Zellkulturkammer gegeben. Anschließend erfolgte die Clot-Polymerisation unter Flow auf dem Wippschüttler (60 rpm) oder statisch für 60 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Plasmaclots mit Zellkulturmedium vorsichtig überschichtet. Nach einer Inkubationsdauer von 48h wurden die Zellen mit Calcein-AM angefärbt und das Zellverhalten sowie die -morphologie mittels Laser-Scanning-Mikroskopie mit dem 10x und 20x Objektiv analysiert.

3.2.17 Testung der optimierten Fibrinmatrices in klinisch einsetzbaren Nerven-Konduits

Zum Abschluss der Studie wurden die optimierten Fibrinmatrices in klinisch einsetzbaren Chitosan-Konduits (Reaxon Nerve Guide, Fa. Medovent, Mainz) getestet (Abb. 33B). Diese Nervenleitschiene besteht aus einem transparenten Hydrogel auf Chitosan-Basis, das die Nährstoffzufuhr und den Transport von Sauerstoff zum regenerierenden Nerv fördert.

Da die Chitosan-Konduits sehr kostspielig waren, wurde alternativ für Vorversuche zur Überprüfung der Ausrichtungsmethoden ein Teflon-Schlauch verwendet. Dieser Teflon-Schlauch hatte – wie die später verwendeten Chitosan-Leitschienen - eine Länge von 30mm und einen Durchmesser von 4mm (Abb. 33A). Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der integrierten Fibrinfasern wurde ein Fenster von 5mm x 3mm in die Mitte des Schlauchs geschnitten.

Für die Ausrichtungsversuche unter Flow wurde der Teflon-Schlauch vorsichtig von den Schlauchenden aus mit 600µl Clotgemisch befüllt. Anschließend wurde der Schlauch an den Enden mit passenden Plastikkappen verschlossen und in der selbst angefertigten Halterung aus Acrylglas fixiert (Abb. 33A).

Folgende Prozessparameter wurden getestet:

- statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation)
- Einstellungen Wippschüttler: Neigungswinkel 5° / Wippbewegung: 80 rpm

Für Zellversuche wurden MSC im ersten Schritt mit Cytopainter green (abcam / Ex/Em: 490/520) nach Herstellerangaben für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI wurden die Zellen zum Plasmaclot-Gemisch zugefügt.

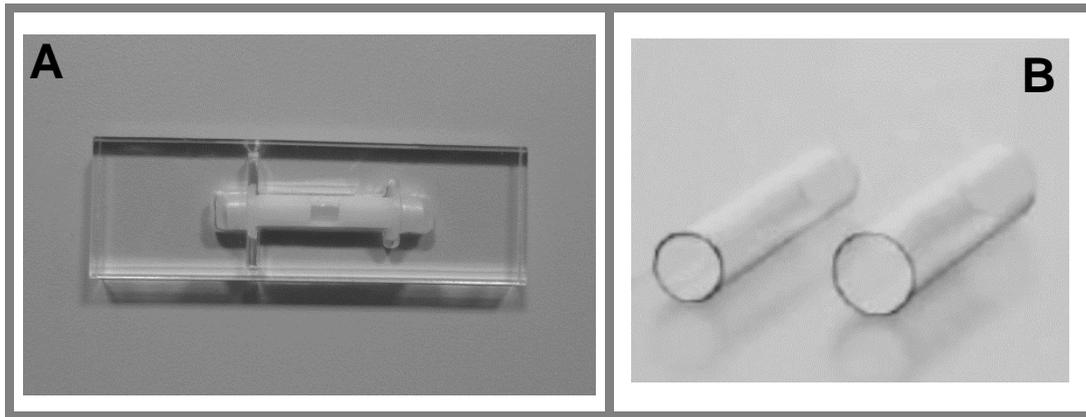


Abb. 33A: Teflon-Schlauch, fixiert in Acrylglas-Halterung. B: Klinisch zugelassene Chitosan-Konduits (Reaxon Nerve Guide, Medovent). Die Maße des Chitosan-Konduits betragen: Länge 30mm; Innendurchmesser: 4,0 mm.

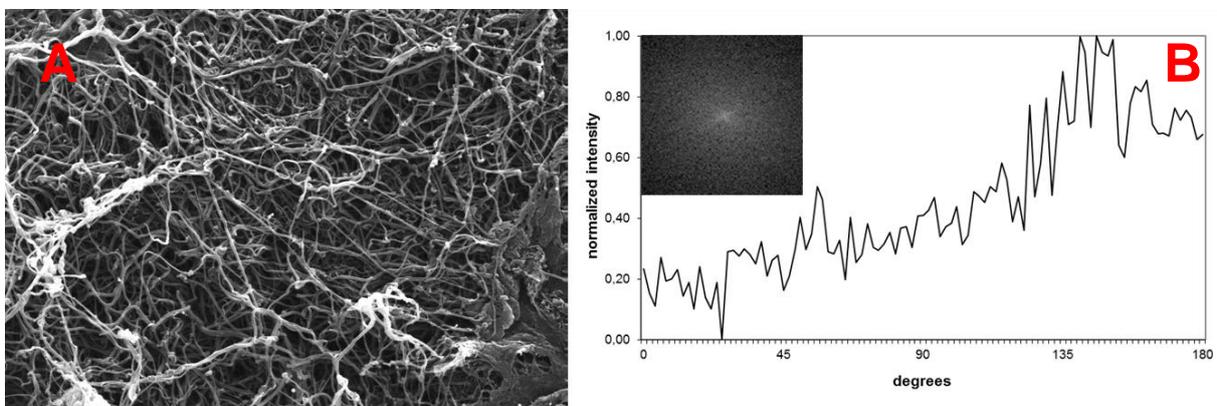
Nach Beendigung der Vorversuche wurden die gleichen Versuchsbedingungen mit den Chitosan-Konduits getestet.

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

4.1 Clot-Polymerisation unter Flow-Bedingungen

4.1.1 Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Fibrinfaserausrichtungen

Die jeweils entstandenen Fibrinfaserausrichtungen wurden zunächst mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die resultierenden Faserausrichtungen wurden mit der Fast Fourier Transformation (FFT) ausgewertet. Ergänzend wurde die Halbwertsbreite (Full Width at Half Maximum, FWHM) und die Peak Area X_{\min} to X_{\max} sowie der Alignment Index berechnet.



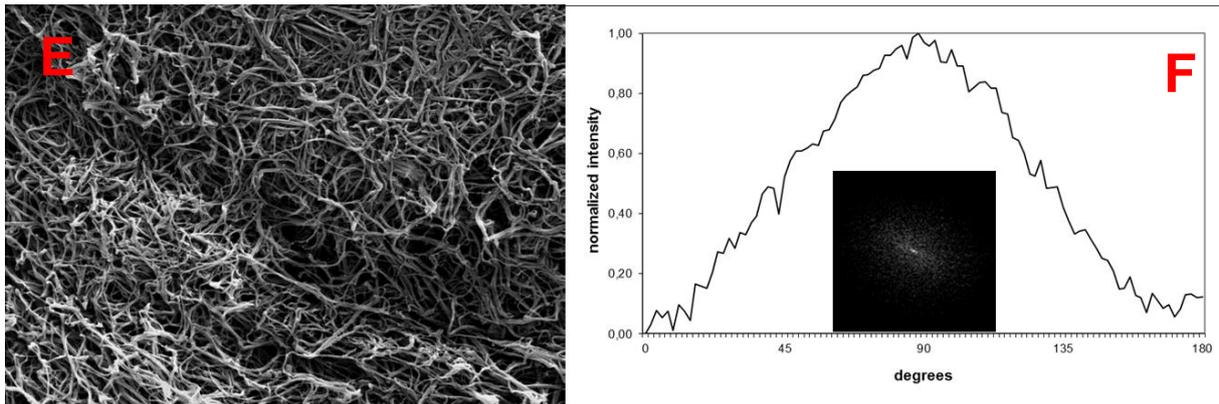
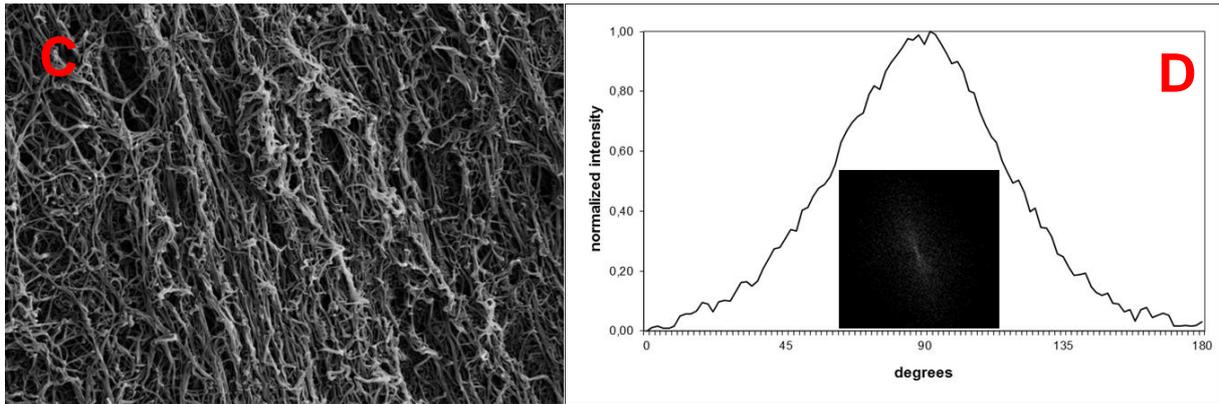
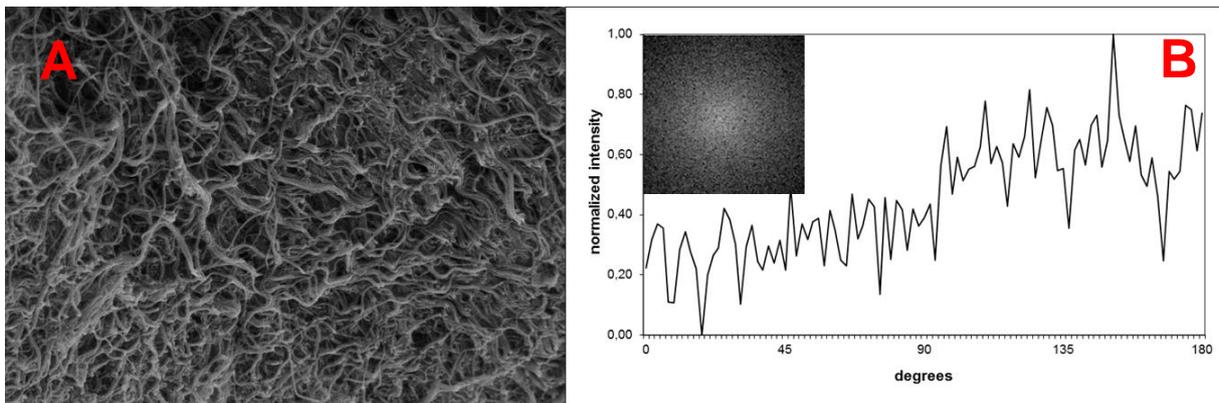


Abb. 34: Repräsentative REM-Aufnahmen (A, C und E) sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots eines polymerisierten Kontroll-Clots (A und B) sowie eines Plasmaclots nach Polymerisierung auf dem Wippschüttler (C und D) mit einer Wippbewegung von 80 rpm und auf dem Horizontalschüttler (E und F) mit einer Horizontalbewegung von 70 rpm. Plasmaclots wurden mit einem Plasmaanteil von 50% hergestellt.



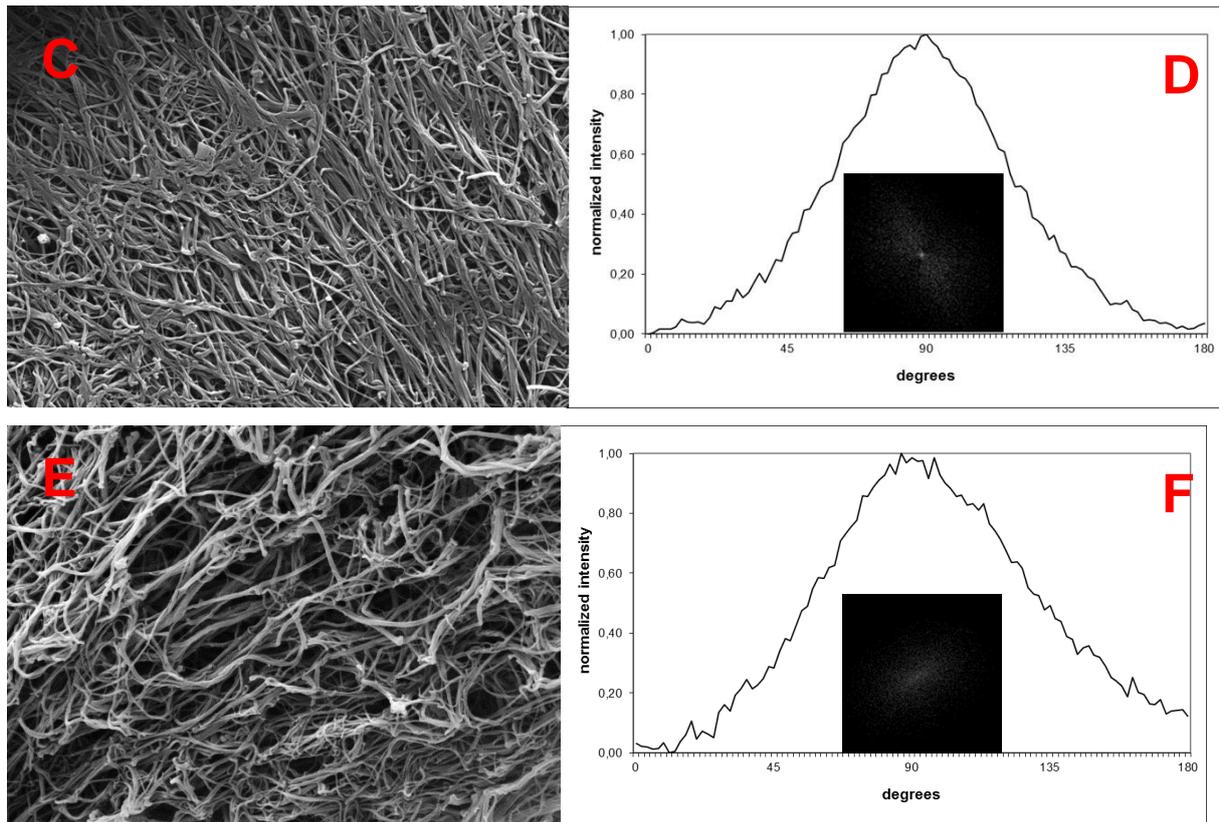


Abb. 35: Repräsentative REM-Aufnahmen (A, C und E) sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots eines polymerisierten Kontroll-Clots (A und B) sowie eines Clots nach Polymerisierung auf dem Wippschüttler (C und D) mit einer Wippbewegung von 80 rpm und auf dem Horizontalschüttler (E und F) mit einer Horizontalbewegung von 70 rpm. Plasmaclots wurden mit einem Plasmaanteil von 75% hergestellt.

Kontrollclots mit einem Plasmaanteil von 50% und 75% formten ein zufällig organisiertes, homogenes Netzwerk (Abb. 34A und 35A), während Clots nach fließinduzierter Polymerisation auf dem Wipp- und Horizontalschüttler längs orientierte Fibrinfasern zeigten (Abb. 34C und 34E; Abb. 35C und 35E). Plasmaclots bestanden hier hauptsächlich aus gerichteten großen Faserbündeln, die durch dünne Fasern verbunden waren. Die Ausrichtung erfolgte in Flow-Richtung. Diese Ergebnisse wurden mit der Fast Fourier Transformation bestätigt (Abb. 34D und 34F; Abb. 35D und 35F). Die Faserausrichtung der Plasmaclots wurde hier durch die Höhe und Form der Peaks wiedergegeben.

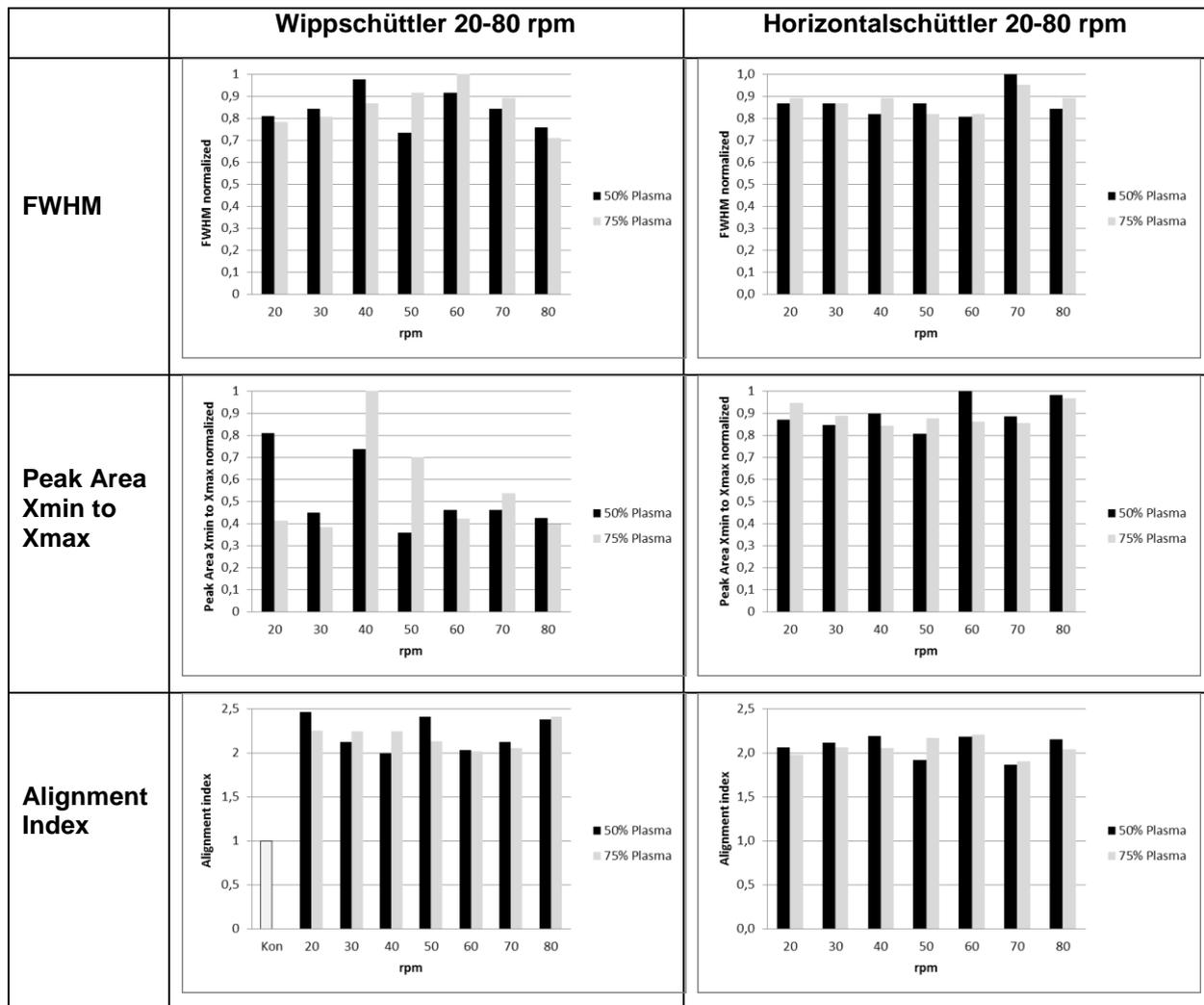


Abb. 36: Auswertung der FFT-Analyse. Graphische Darstellung der FWHM (Peakbreite in der halben Höhe des Maximums) und Peak Area Xmin to Xmax nach Normalisierung der Daten sowie des Alignment Index in Abhängigkeit von der Flow-Bewegung.

Die minimale FWHM sowie die minimale Peak Area als auch der maximale Alignment Index repräsentieren die stärkste Längsorientierung.

Um die Abhängigkeit der Fibrinfaserausrichtung von der Wipp- bzw. Horizontalbewegung (20 – 80 rpm) zu quantifizieren, wurden die Halbwertsbreite FWHM und die Peak Area Xmin to Xmax der FFT-Peaks sowie der Alignment Index berechnet. Nach Normalisierung der Daten (FWHM bzw. Peak Area) wurden diese Parameter in Abhängigkeit von der Flow-Bewegung in einem Diagramm aufgetragen und in Abbildung 36 zusammengefasst. Während die minimale FWHM für Plasmaclots mit 50% Plasma bei einer Wippbewegung von 50 rpm (0,7349) zu finden war, lag das Minimum für Clots mit 75% Plasma bei 80 rpm (0,7108). Die FWHM-Minima zeigten, dass bei diesen Wippgeschwindigkeiten die Längsorientierung der Fibrinfasern besonders ausgeprägt war.

Auffallend war, dass die ermittelten Halbwertsbreiten beim Horizontalschüttler im Bereich von 20 – 60 rpm und 80 rpm nicht stark variierten. Die Werte lagen bei Plasmaclots mit 50%

Plasma zwischen 0,8072 und 0,8675 und mit 75% Plasma zwischen 0,8193 und 0,8916. Die minimale FWHM betrug für Clots mit 50% Plasma 0,8072 (60 rpm) bzw. mit 75% Plasma 0,8193 (50 – 60 rpm). Durch das Auftreten der FWHM-Minima zeigte sich, dass es bei beiden Ausrichtungsmethoden einen Geschwindigkeitsbereich gab, bei dem die Längsorientierung der Fibrinfasern am stärksten ausgebildet war. Die Geschwindigkeit der unidirektionalen Bewegung spielte demnach bei beiden Methoden eine wichtige Rolle für die Ausbildung einer longitudinalen Faserorientierung, allerdings war sie nicht alleine für diese verantwortlich. Sowohl die Werte der Peak Area als auch der berechnete Alignment Index bestätigten dieses Ergebnis.

Um die Auswirkungen des Plasmaanteils in Kombination mit den beiden unterschiedlichen Polymerisationsbedingungen und den variierenden Prozessparametern auf die Plasmaclot-Architektur (Fibrinfasern) zu bestimmen, wurde zusätzlich in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen die mittlere Clot-Faserdicke aus einer Vielzahl an Messungen ermittelt (Abb. 37; Tab. 5).

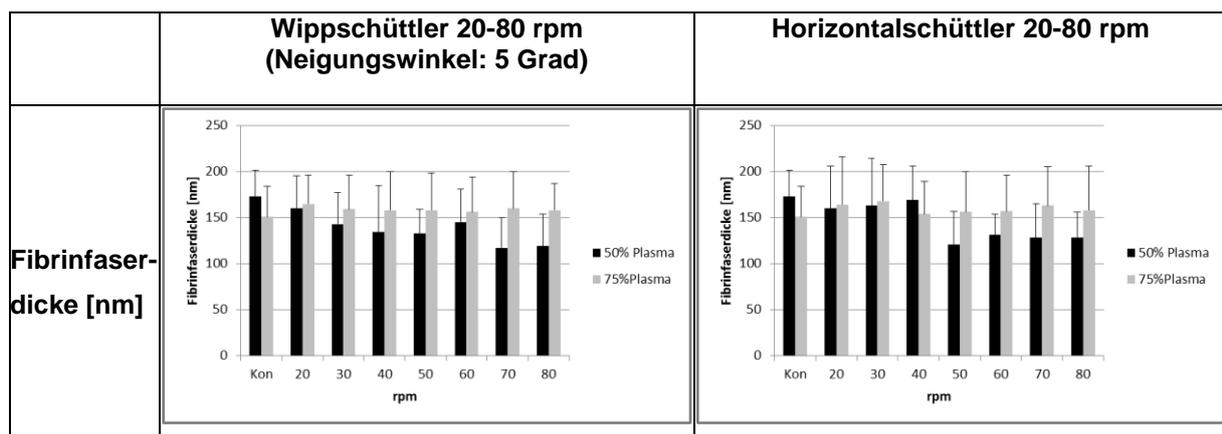


Abb. 37: Graphische Darstellung der mittleren Fibrinfaserdicke und Standardabweichung in Abhängigkeit von der Wipp- bzw. Horizontalgeschwindigkeit.

Tab. 5: Fibrinfaserdicke von Plasmaclots, hergestellt aus 50% Plasma und 75% Plasma in 2-Chamber-Slides. Clot-Polymerisation unter unidirektionaler Bewegung auf dem Wipp- und Horizontalschüttler (20 – 80 rpm) bzw. statisch (Kon). (MW ± Stabw.)

	Wippschüttler 20 – 80 rpm Fibrinfaserdicke [nm]		Horizontalschüttler 20 – 80 rpm Fibrinfaserdicke [nm]	
	50% Plasma	75% Plasma	50% Plasma	75% Plasma
20 rpm	160 ± 35	165 ± 31	160 ± 46	164 ± 52
30 rpm	143 ± 34	159 ± 37	163 ± 51	168 ± 39
40 rpm	134 ± 51	158 ± 42	169 ± 37	154 ± 35
50 rpm	133 ± 26	158 ± 40	121 ± 36	156 ± 44
60 rpm	145 ± 36	156 ± 38	131 ± 23	157 ± 39
70 rpm	117 ± 33	160 ± 40	128 ± 37	163 ± 42
80 rpm	119 ± 35	158 ± 29	128 ± 28	158 ± 48
Kon	173 ± 28	151 ± 33	173 ± 28	151 ± 33

Die statistische Analyse der Ergebnisse zeigte, dass die Plasmaclot-Zusammensetzung insbesondere des Plasmaanteils ein entscheidendes Kriterium für die Faserdicke darstellt. Desweiteren hatte die Geschwindigkeit der unidirektionalen Bewegung sowohl auf dem Wipp- als auch auf dem Horizontalschüttler einen signifikanten Effekt auf die Faserdicke von Clots mit einem Plasmaanteil von 50%. Die Gruppen zeigten untereinander hochsignifikante Unterschiede im Kruskal-Wallis-Test ($p < 0,001$) (Tab. 6). Die gemessenen Faserdicken von Plasmaclots nach Polymerisation auf dem Wippschüttler wiesen im Mann-Whitney-U-Test signifikant niedrigere Werte als die der Kontrollclots auf (20 rpm: $p < 0,05$; 30 – 50 rpm: jeweils $p < 0,001$; 60 rpm: $p < 0,001$; 70 – 80 rpm: jeweils $p < 0,001$). Die Einzelvergleiche der Faserdicken aller Wippgeschwindigkeiten (20 rpm – 80 rpm) werden detailliert in Tabelle 6 dokumentiert.

Die Werte der gemessenen Faserdicken von Plasmaclots mit einem Plasmaanteil von 75% waren dagegen nach Polymerisation auf dem Wippschüttler im Kruskal-Wallis Test nicht signifikant ($p = 0,1418$) (Tab. 6).

Tab. 6: Statistische Analyse der gemessenen Faserdicken von Plasmaclots (Plasmaanteil 50% und 75%) nach Polymerisation auf dem Wippschüttler mit unterschiedlicher Wippgeschwindigkeit (20 - 80rpm). Gruppenanalysen für Plasmaclots mit einem Plasmaanteil von 50% bzw. 75% wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test, Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Da die Werte der gemessenen Faserdicken von Plasmaclots mit einem Plasmaanteil von 75% im Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant waren, wurde die Signifikanz der Werte im Mann-Whitney-U-Test nur für Clots, die mit 50% Plasma hergestellt wurden, überprüft.

Plasma	50%	75%							
Kruskal-Wallis	p<0,001	N / S							
U-Test	Kon	20 rpm	30 rpm	40 rpm	50 rpm	60 rpm	70 rpm	80 rpm	
Kon	_____	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
20 rpm	p<0,05	_____	p<0,05	p<0,001	p<0,001	N / S	p<0,001	p<0,001	
30 rpm	p<0,001	p<0,05	_____	N / S	N / S	N / S	p<0,001	p<0,001	
40 rpm	p<0,001	p<0,001	N / S	_____	N / S	N / S	N / S	N / S	
50 rpm	p<0,001	p<0,001	N / S	N / S	_____	N / S	p<0,01	p<0,05	
60 rpm	p<0,001	N / S	N / S	N / S	N / S	_____	p<0,001	p<0,001	
70 rpm	p<0,001	p<0,001	p<0,001	N / S	p<0,001	p<0,001	_____	N / S	
80 rpm	p<0,001	p<0,001	p<0,001	N / S	p<0,05	p<0,001	N / S	_____	

Auch die Faserdicken von Plasmaclots nach Koagulation auf dem Horizontalschüttler unterschieden sich signifikant von Kontrollclots (20 rpm: p<0,05; 50 – 80 rpm: jeweils p<0,001; Mann-Whitney-U-Test) (Tab. 7). Die Faserdicken von Clots nach Polymerisation unter einer Horizontalbewegung von 30 rpm und 40 rpm zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die Einzelvergleiche der Faserdicken aller Horizontalgeschwindigkeiten (20 rpm – 80 rpm) werden in Tabelle 7 detailliert dargestellt.

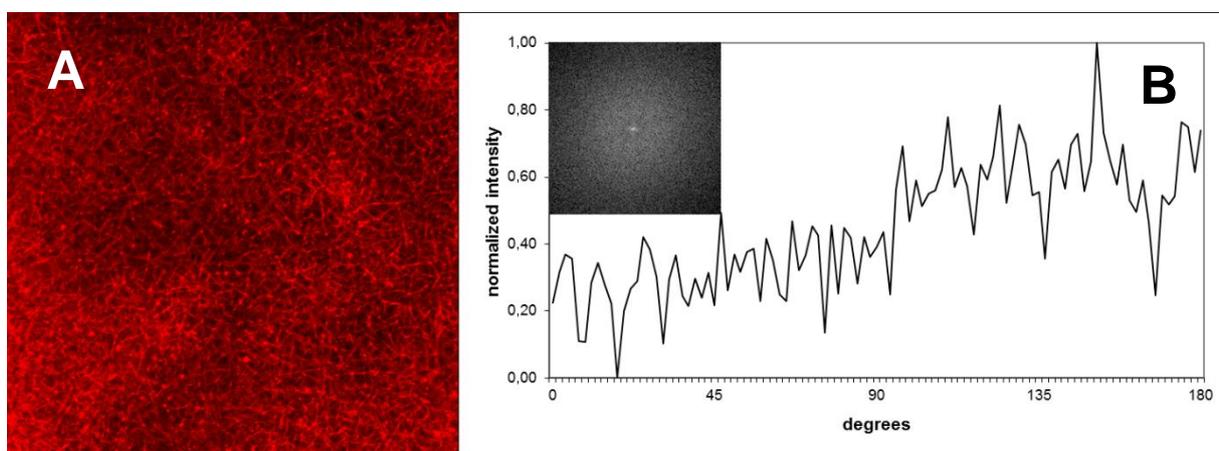
Die Werte der gemessenen Faserdicken von Plasmaclots mit einem Plasmaanteil von 75% zeigten nach Polymerisation auf dem Horizontalschüttler im Kruskal-Wallis Test keine Signifikanz (p = 0,1206) (Tab. 7).

Tab. 7: Statistische Analyse der gemessenen Faserdicken von Plasmaclots (Plasmaanteil 50% und 75%) nach Polymerisation auf dem Horizontalschüttler mit unterschiedlicher Horizontalgeschwindigkeit (20 - 80rpm). Gruppenanalysen für Plasmaclots mit einem Plasmaanteil von 50% bzw. 75% wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test, Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Da die Werte der gemessenen Faserdicken von Plasmaclots mit einem Plasmaanteil von 75% im Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant waren, wurde die Signifikanz der Werte im Mann-Whitney-U-Test nur für Clots, die mit 50% Plasma hergestellt wurden, überprüft.

Plasma	50%	75%							
Kruskal-Wallis	p<0,001	N / S							
U-Test	Kon	20 rpm	30 rpm	40 rpm	50 rpm	60 rpm	70 rpm	80 rpm	
Kon	_____	p<0,05	N / S	N / S	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
20 rpm	p<0,05	_____	N / S	N / S	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
30 rpm	N / S	N / S	_____	N / S	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
40 rpm	N / S	N / S	N / S	_____	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
50 rpm	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	_____	N / S	N / S	N / S	
60 rpm	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	N / S	_____	N / S	N / S	
70 rpm	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	N / S	N / S	_____	N / S	
80 rpm	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	N / S	N / S	N / S	_____	

4.1.2 LSM-Analyse der Fibrinfaserausrichtungen

Zusätzlich wurden die entstandenen Fibrinfaserausrichtungen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Die resultierenden Aufnahmen wurden ebenfalls mit der Fast Fourier Transformation (FFT) ausgewertet (Abb. 38 und 39). Ergänzend wurde auch hier die Halbwertsbreite (Full Width at Half Maximum, FWHM) und die Peak Area X_{\min} to X_{\max} sowie der Alignment Index berechnet.



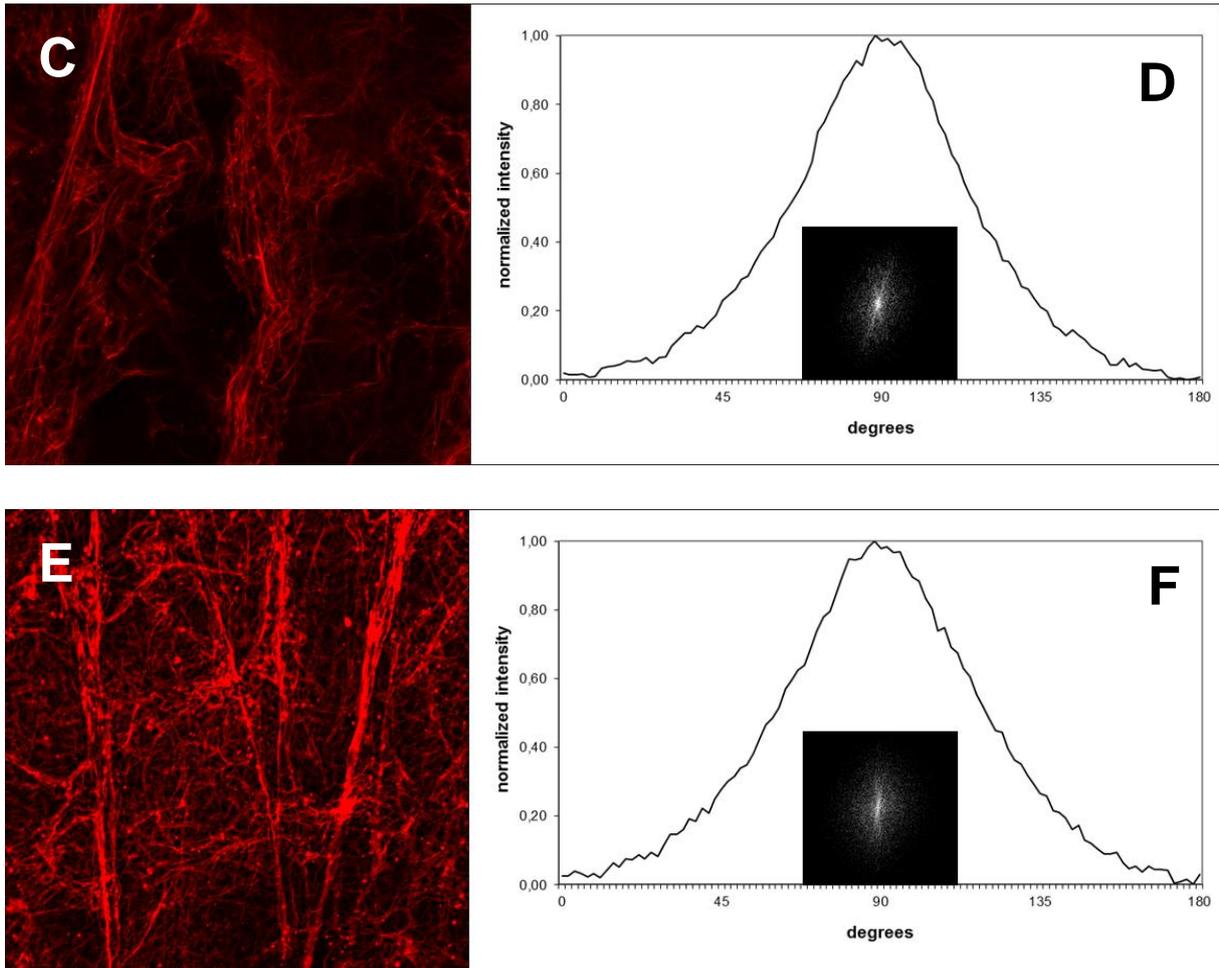


Abb. 38: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen (A, C und E) sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots eines polymerisierten Kontroll-Clots (A und B) sowie eines Plasmaclots nach Polymerisierung auf dem Wippschüttler (C und D) mit einer Wippbewegung von 50 rpm und auf dem Horizontalschüttler (E und F) mit einer Horizontalbewegung von 60 rpm. Plasmaclots wurden mit einem Plasmaanteil von 50% hergestellt.

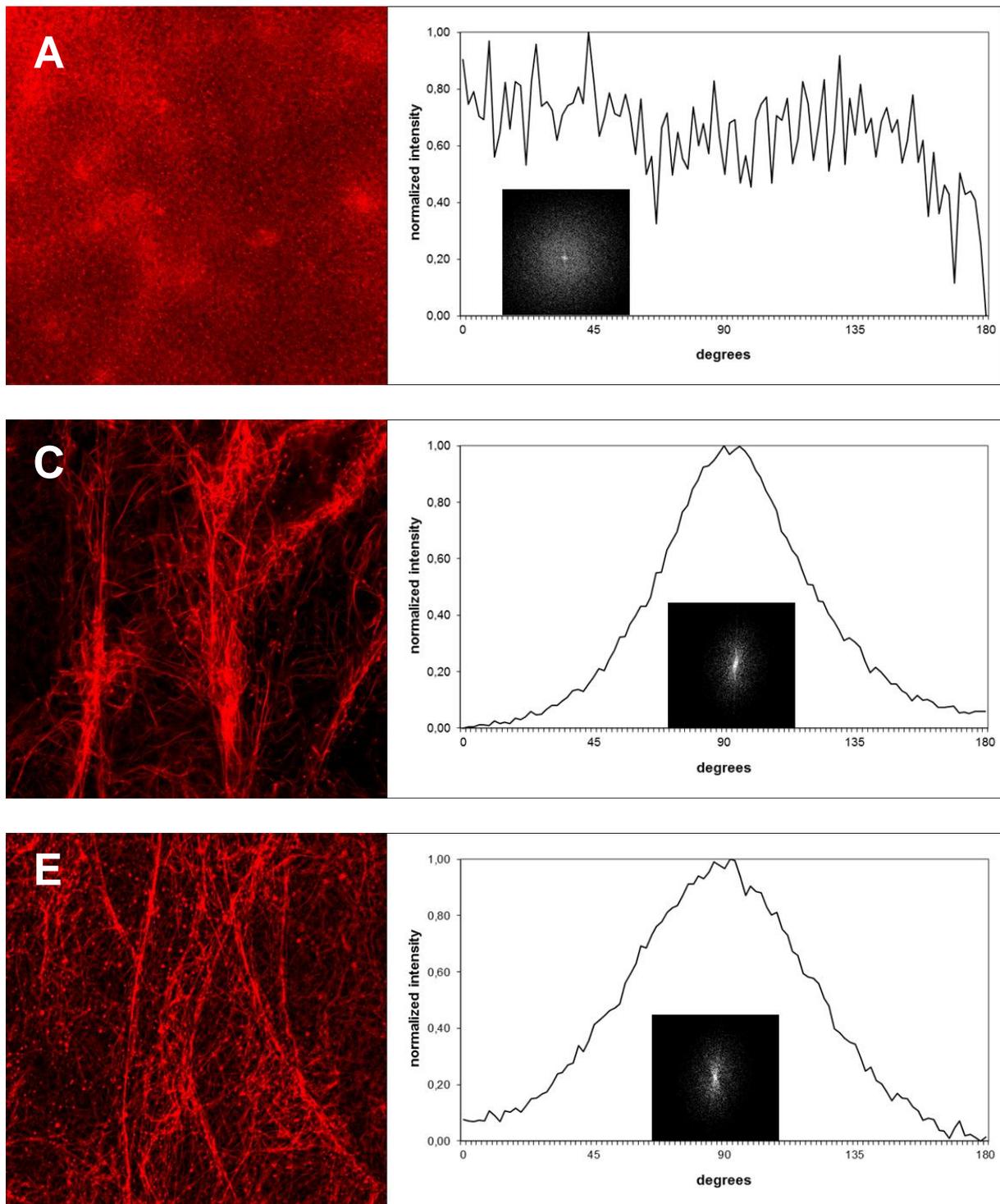


Abb. 39: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen (A, C und E) sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots eines polymerisierten Kontroll-Clots (A und B) sowie eines Plasmaclots nach Polymerisierung auf dem Wippschüttler (C und D) mit einer Wippbewegung von 50 rpm und auf dem Horizontalschüttler (E und F) mit einer Horizontalbewegung von 70 rpm. Plasmaclots wurden mit einem Plasmaanteil von 75% hergestellt.

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie bestätigte die Ergebnisse der REM-Analyse. Ebenfalls wie bei der Rasterelektronenmikroskopie wurden hier die Peaks der FFT-Analyse durch Berechnung der Halbwertsbreite FWHM und der Peak Area Xmin to Xmax sowie des

Alignment Index genauer untersucht. Nach Normalisierung der Daten (FWHM bzw. Peak Area) wurden diese Parameter in Abhängigkeit von der Flow-Bewegung in einem Diagramm aufgetragen und in Abbildung 40 zusammengefasst.

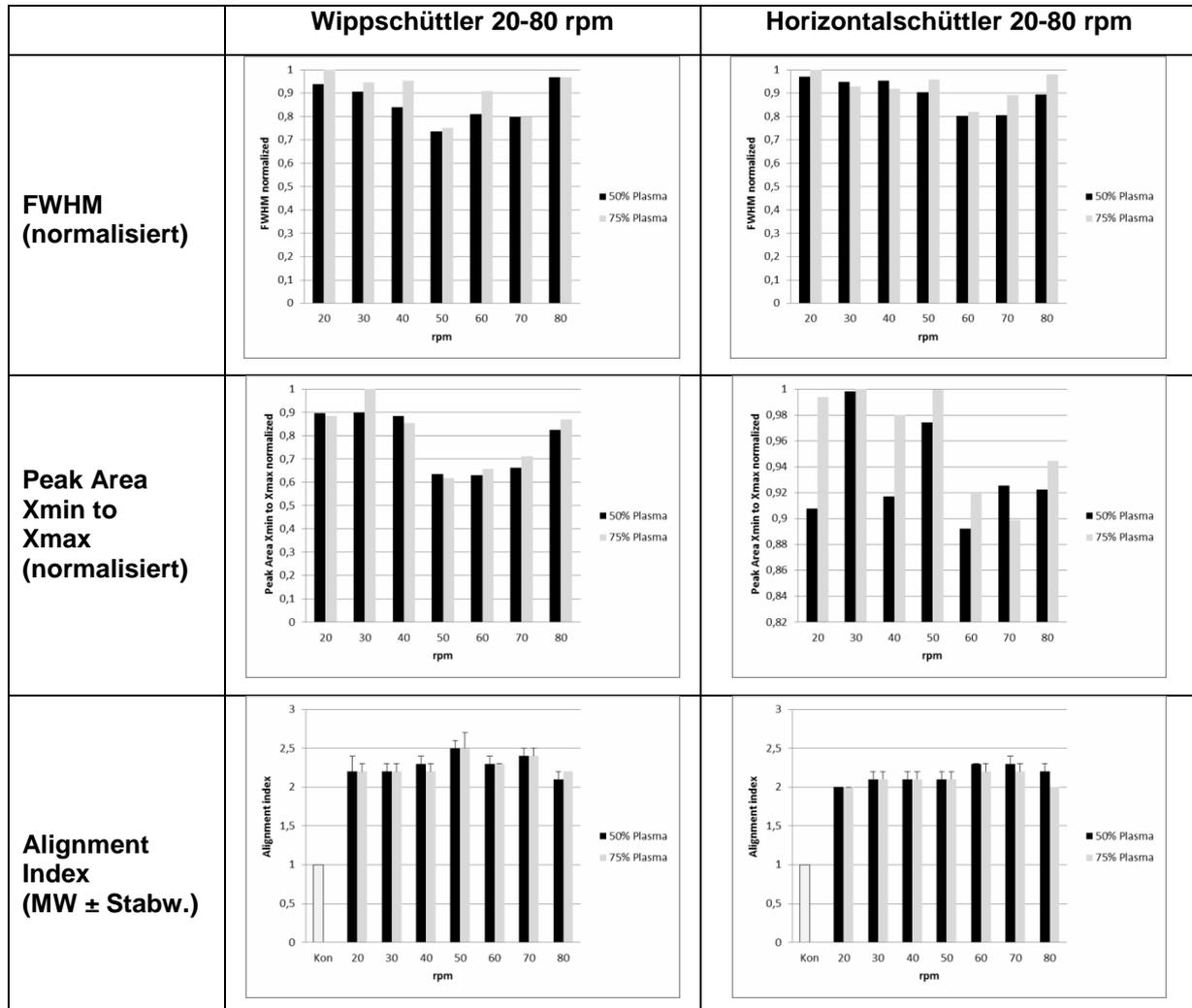


Abb. 40: Auswertung der FFT-Analyse. Graphische Darstellung der FWHM (Peakbreite in der halben Höhe des Maximums) und Peak Area Xmin to Xmax nach Normalisierung der Daten sowie des Alignment Index in Abhängigkeit von der Flow-Bewegung.

Die minimale FWHM sowie die minimale Peak Area als auch der maximale Alignment Index repräsentieren die stärkste Längsorientierung.

Ein ausgeprägtes FWHM-Minimum zeigte sich für Plasmaclots mit 50% Plasma bei einer Wippbewegung von 50 rpm (0,6355) sowie bei 60 rpm (0,6293). Das Minimum für Clots mit 75% Plasma lag ebenfalls bei 50 rpm (0,6171) und 60 rpm (0,6574).

Nach Polymerisation auf dem Horizontalschüttler betrug die minimale FWHM für Clots mit 50% Plasma 0,7370 (50 rpm) bzw. mit 75% Plasma 0,7514 (50 rpm).

Die minimale Peak Area lag für Plasmaclots mit 50% Plasma bei einer Wippbewegung von 60 rpm (0,6293) sowie mit 75% Plasma bei 50 rpm (0,6171). Nach Polymerisation auf dem Horizontalschüttler wurde das Peak Minimum für Clots mit 50% Plasma bei einer Horizontalbewegung von 60 rpm (0,8921) und mit 75% Plasma bei 70 rpm (0,8987) bestimmt. Der höchste Alignment Index lag sowohl für Clots mit 50% Plasma als auch mit 75% bei einer Wippbewegung von 50 rpm ($2,5 \pm 0,1$) und einer Horizontalbewegung von 60 rpm und 70 rpm (50% Plasma: $2,3 \pm 0,1$; 75% Plasma: $2,2 \pm 0,1$).

Die Werte der FWHM als auch der Peak Area und des Alignment Index zeigten, dass die Längsorientierung der Fibrinfasern nach Polymerisation auf dem Wippschüttler stärker ausgeprägt war als auf dem Horizontalschüttler.

Die Laser-Scanning-Mikroskopie erzielte im Hinblick auf die Faserausrichtung bessere und prägnantere FFT-Ergebnisse als die Rasterelektronenmikroskopie, da bei dieser nichtinvasiven Untersuchungsmethode keine zusätzliche Probenaufarbeitung erforderlich war. Sie hat sich für die Datenerhebung als empfindlicherer Indikator bezüglich Ausrichtungsänderungen im Plasmaclot dargestellt. Auf der Grundlage der Laser-Scanning-Mikroskopie in Kombination mit der FFT-Analyse wurde daher eine Messmethode entwickelt, die es möglich macht, Veränderungen der mittleren Orientierung der Netzwerkstruktur des Plasmaclots quantitativ zu erfassen. Weitere FFT-Analysen wurden daher nur bei Laser-Scanning-Aufnahmen durchgeführt.

Ein wesentlicher Nachteil der Rasterelektronenmikroskopie ist neben dem großen apparativen Aufwand die Probenaufarbeitung der Plasmaclots. Da in der Rasterelektronenmikroskopie nur leitende Oberflächen dargestellt werden können, müssen die Proben speziell präpariert werden. Durch Aufdampfen eines Metallfilmes (Gold / Palladium) werden die Oberflächen von biologischen Proben wie dem Plasmaclot leitend gemacht. Diese Schicht darf dabei nicht zu dick gesputtert werden, weil sonst die feinen Strukturen der Clots abgedeckt werden. Da die Abtastung mit dem Elektronenstrahl im Hochvakuum stattfindet, müssen die Clots außerdem vor dem Sputtern so präpariert werden, dass sie absolut wasserfrei sind. Weitere Nachteile sind, dass bei der Rasterelektronenmikroskopie keine Untersuchungen an lebenden Zellen möglich sind und nur schwarz-weiß-Bilder erstellt werden können.

4.1.3 Statistische Analyse der Fibrinfaserausrichtungen auf dem Wipp- bzw.

Horizontalschüttler

Für die statistische Auswertung der Fibrinfaserausrichtung auf dem Wipp- bzw. Horizontalschüttler wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test überprüft, ob sich die zentrale Tendenz von

mehr als zwei unabhängigen Gruppen (Geschwindigkeit: 20 rpm - 80 rpm) unterschied. Da der Kruskal-Wallis-Test aber keine Auskunft darüber gibt, welche zentralen Tendenzen sich signifikant von den anderen unterscheiden, wurde der Mann-Whitney-U-Test für paarweise Vergleiche der Gruppen eingesetzt.

Insgesamt wurden die Daten, in Abhängigkeit von dem Plasmaanteil der Clots (50% und 75% Plasma), in 7 Gruppen (20 rpm – 80 rpm) unterteilt.

Vergleichswert bei den U-Tests war immer der Wert des Parameters, bei der die jeweilige Methode den niedrigsten FWHM zeigte, da dieser Wert die beste Fibrinfaserausrichtung repräsentierte. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $p \leq 0,05$ und als nicht signifikant (N / S) wurden $p \geq 0,075$ angenommen. Werte von $0,05 < p < 0,075$ wurden als Trend berücksichtigt.

Der Kruskal-Wallis-Test zeigte sowohl bei der FWHM als auch bei der Peak Area bei allen Gruppen nach Fibrinfaserausrichtung auf dem Wippschüttler eine Signifikanz, woraufhin der Mann-Whitney-U-Test für Paarvergleiche durchgeführt wurde (Tab. 8). Als Vergleichswert wurde hier 50 rpm eingesetzt, der ein ausgeprägtes FWHM-Minimum sowohl bei einem Plasmaanteil von 50% als auch von 75% aufwies (Abb. 40). Der Mann-Whitney-U-Test ergab bei der FWHM signifikante Unterschiede zwischen dem Vergleichswert 50 rpm vs. 20 rpm, 30 rpm, 60 rpm und 80 rpm bei der Gruppe 50% Plasma und vs. 20 rpm, 30 rpm, 40 rpm und 80 rpm bei der Gruppe 75% Plasma. Allerdings zeigte sich keine Signifikanz zwischen 50 rpm und 70 rpm bei beiden Gruppen (50% und 75% Plasmaanteil) und zusätzlich zwischen 50 rpm und 60 rpm bei der Gruppe mit 75% Plasmaanteil. Der Vergleich zu 40 rpm wies mit $p=0,073$ bei der Gruppe 50% Plasma eine Tendenz zur Signifikanz auf. Die statistische Analyse bestätigte, dass bei einer Wippgeschwindigkeit von 50 rpm im Vergleich zu den anderen Wippgeschwindigkeiten der signifikant niedrigste FWHM-Wert erzielt wurde.

Bei genauerem Vergleich der Peak Areas mittels Mann-Whitney-U-Test wurde ersichtlich, dass sich der Vergleichswert 50 rpm von 20 rpm, 30 rpm, 40 rpm und 80 rpm bei beiden Gruppen (50% und 75% Plasmaanteil) signifikant unterschied (Tab. 8). Dagegen zeigte sich keine Signifikanz zwischen 60 rpm bei beiden Gruppen (50% und 75% Plasmaanteil) und zusätzlich zwischen 50 rpm und 70 rpm bei der Gruppe mit 50% Plasmaanteil. Bei der Gruppe 75% Plasma wies der Vergleich zwischen 50 rpm und 70 rpm mit $p=0,063$ eine Tendenz zur Signifikanz auf.

Tab. 8: Statistische Analyse (p-Werte) der FWHM und Peak Areas nach Fibrinfaserausrichtung auf dem Wippschüttler mit unterschiedlicher Wippsgeschwindigkeit (20 - 80rpm). Gruppenanalysen (Plasmaanteil: 50% bzw. 75%) wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test, bei Signifikanz Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei den Einzelvergleichen wurden FWHM- bzw. Peak Area-Werte, die bei einer Wippsgeschwindigkeit von 50 rpm erzielt wurden, als Vergleichswert eingesetzt.

	FWHM		Peak Area	
	50%	75%	50%	75%
Plasma				
Kruskal-Wallis	p<0,05	p<0,05	p<0,001	p<0,001
U-Test	50 rpm			
20 rpm	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
30 rpm	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
40 rpm	p=0,073	p<0,05	p<0,05	p<0,05
50 rpm	————	————	————	————
60 rpm	p<0,05	N / S	N / S	N / S
70 rpm	N / S	N / S	N / S	p=0,063
80 rpm	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,005

Bei der Fibrinfaserausrichtung auf dem Horizontalschüttler zeigte der Kruskal-Wallis-Test nur bei der FWHM signifikante Unterschiede (Tab. 9). Beim anschließenden Mann-Whitney-U-Test wurde als Vergleichswert 60 rpm eingesetzt, der ein ausgeprägtes FWHM-Minimum sowohl bei einem Plasmaanteil von 50% als auch von 75% dokumentierte (Abb. 36). Beim Vergleich zeigte sich, dass der Vergleichswert 60 rpm gegenüber 20 rpm, 30 rpm, 40 rpm, 50 rpm und 80 rpm bei beiden Gruppen (50% und 75% Plasma) signifikante Unterschiede oder eine Tendenz zur Signifikanz aufwiesen. Der Vergleich zu 70 rpm war bei beiden Gruppen nicht signifikant.

Die statistische Analyse bestätigte, dass bei einer Horizontalgeschwindigkeit von 60 rpm im Vergleich zu den anderen Horizontalgeschwindigkeiten der signifikant niedrigste FWHM-Wert erzielt wurde.

Tab. 9: Statistische Analyse (p-Werte) der FWHM und Peak Areas nach Fibrinfaserausrichtung auf dem Horizontalschüttler mit unterschiedlicher Horizontalgeschwindigkeit (20 - 80rpm). Gruppenanalysen (Plasmaanteil: 50% bzw. 75%) wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test, Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei den Einzelvergleichen wurden FWHM- bzw. Peak Area-Werte, die bei einer Horizontalgeschwindigkeit von 60 rpm erzielt wurden, als Vergleichswert eingesetzt.

	FWHM		Peak Area	
Plasma	50%	75%	50%	75%
Kruskal-Wallis	p<0,05	p<0,05	N / S	N / S
U-Test	60 rpm			
20 rpm	p<0,05	p<0,05	N / S	p=0,057
30 rpm	p<0,05	p<0,05	p=0,063	p<0,05
40 rpm	p<0,05	p=0,057	N / S	N / S
50 rpm	p<0,05	p<0,05	N / S	p=0,057
60 rpm	————	————	————	————
70 rpm	N / S	N / S	N / S	N / S
80 rpm	p<0,05	p<0,05	N / S	N / S

4.2 Clot-Polymerisation im elektrischen Feld

4.2.1 LSM-Analyse der Fibrinfaserausrichtungen

Im elektrischen Feld wurden die Fibrinfasern der Plasmaclots an den Feldlinien des Feldes entlang ausgerichtet. Die entstandenen Fibrinfaserausrichtungen wurden mit Hilfe der konfokalen Laser- Scanning-Mikroskopie analysiert und die resultierenden Aufnahmen wurden mit der Fast Fourier Transformation (FFT) ausgewertet (Abb. 41 und 42). Die quantitative Analyse der FFT basiert auch hier auf der Berechnung der Halbwertsbreite (Full Width at Half Maximum, FWHM) und der Peak Area X_{\min} to X_{\max} sowie des Alignment Indexes (Abb. 43).

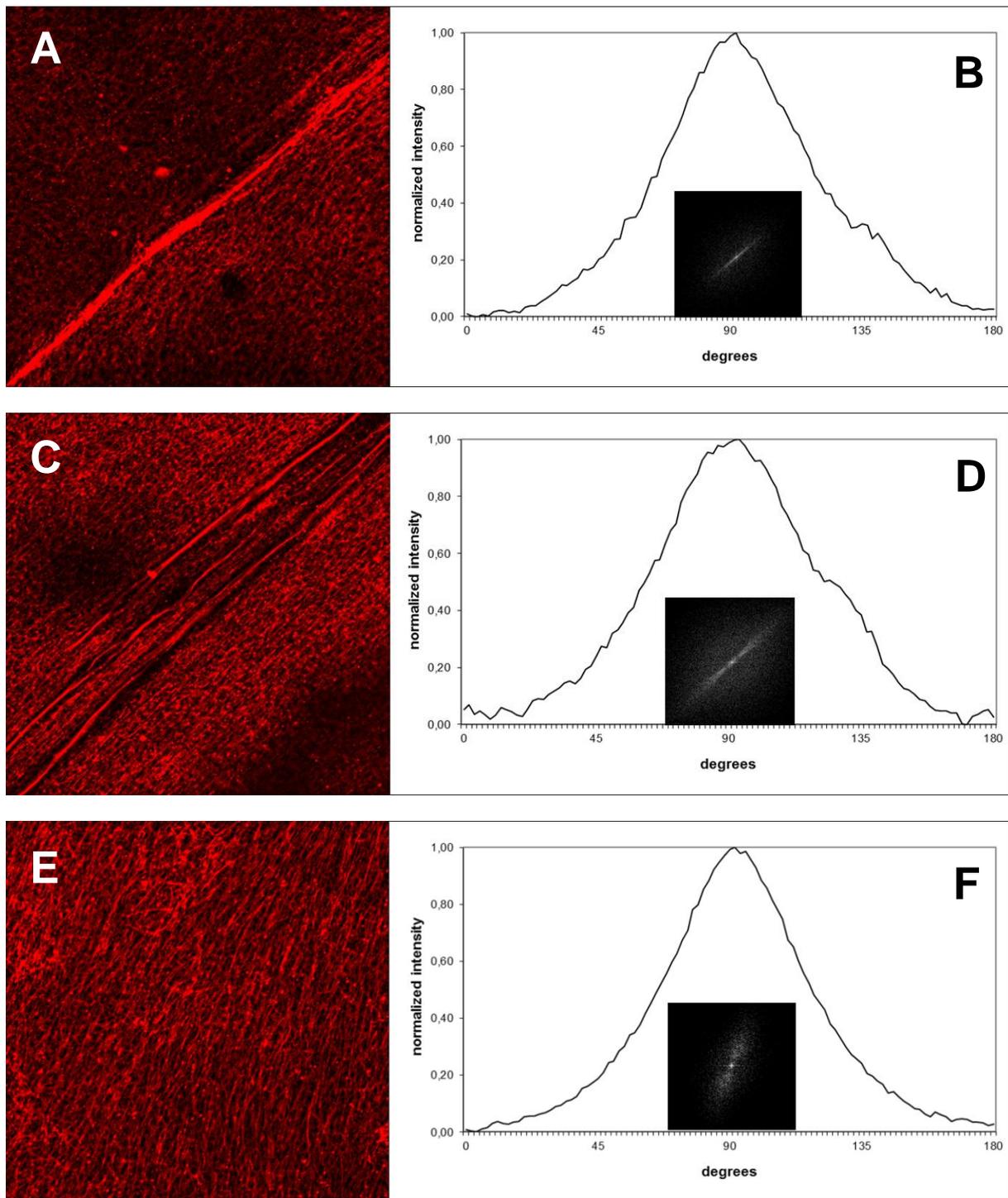


Abb. 41: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots von Plasmaclots nach Polymerisation im elektrischen Feld mit einer Stromspannung von 15 KV (A und B), 20 KV (C und D) und 25 KV (E und F). Plasmaclots wurden mit einem Plasmaanteil von 50% hergestellt.

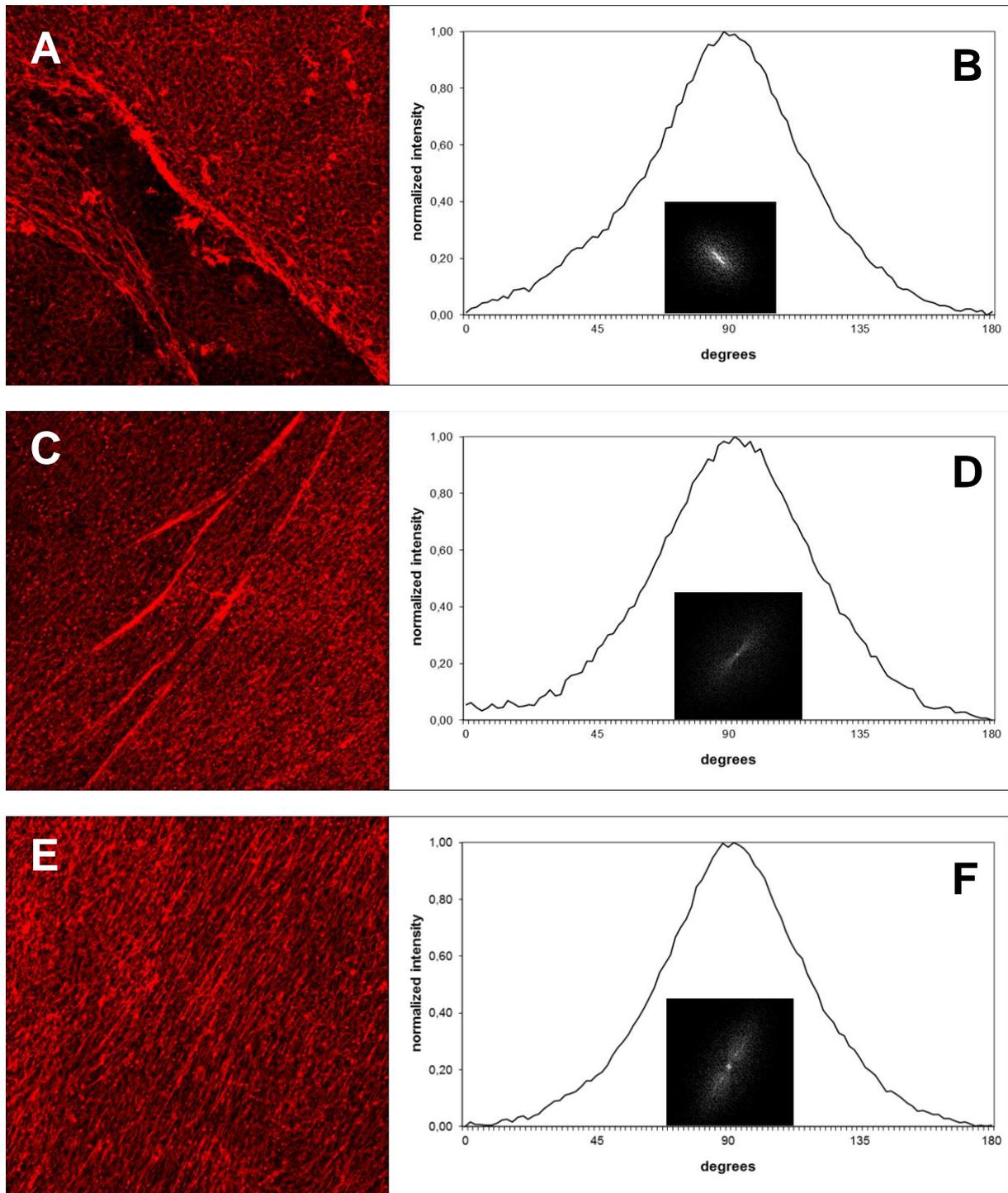


Abb. 42: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots von Plasmaclots nach Polymerisation im elektrischen Feld mit einer Stromspannung von 15 kV (A und B), 20 kV (C und D) und 25 kV (E und F). Plasmaclots wurden mit einem Plasmaanteil von 75% hergestellt.

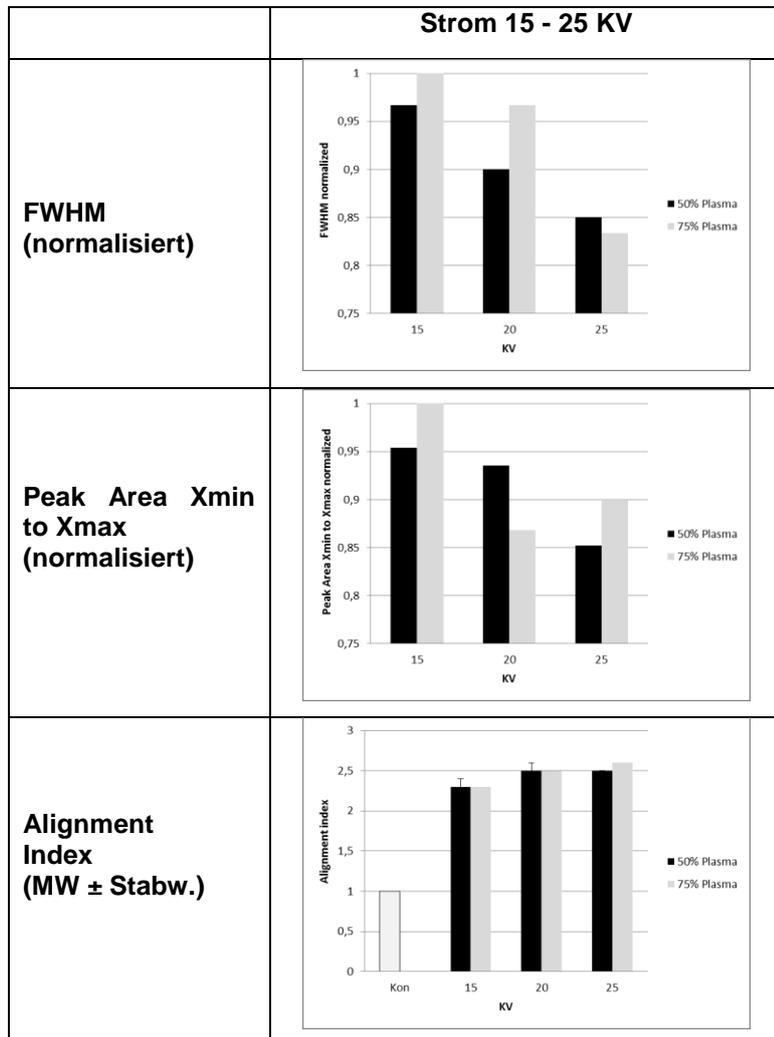


Abb. 43: Auswertung der FFT-Analyse. Graphische Darstellung der FWHM und Peak Area Xmin to Xmax nach Normalisierung der Daten sowie des Alignment Indexes in Abhängigkeit von der Stromspannung.

Die Laser-Scanning-Aufnahmen demonstrierten, dass die Längsorientierung der Fibrinfasern bei dieser Ausrichtungsmethode noch ausgeprägter war als nach fließinduzierten Polymerisationsbedingungen auf dem Wipp- bzw. Horizontalschüttler (Abb. 41A, C, E und Abb. 42A, C und E). Abbildung 43 zeigt, dass sich die FWHM sowie die Peak Area mit zunehmender Spannung deutlich änderten. Diese Werte nahmen mit zunehmender Spannung stetig ab, was bedeutet, dass die Längsorientierung zunahm.

Bei einer Spannung von 15 KV betrug die minimale Halbwertsbreite für Plasmaclots mit 50% Plasma 0,9667, bei 20 KV: 0,9000 und bei 25 KV: 0,8500. Für Plasmaclots mit 75% Plasma lagen die FWHM-Minima bei 1,000 (15 KV), 0,9667 (20 KV) und 0,8333 (25 KV).

Die Peak Area nahm ebenfalls mit zunehmender Spannung ab. Weiterhin konnte zwar ein maximaler Alignment Index festgestellt werden, jedoch war er bei 20 KV und 25 KV nahezu gleich (50% Plasma / 20 KV: $2,5 \pm 0,1$; 50% Plasma / 25 KV: $2,5 \pm 0$; 75% Plasma / 20 KV: $2,5 \pm 0$; 75% Plasma / 25 KV: $2,6 \pm 0$).

Da eine möglichst ausgeprägte Längsausrichtung der Fibrinfasern angestrebt wurde, waren nach Auswertung dieser Ergebnisse Polymerisationsbedingungen im elektrischen Feld sowohl bei 20 KV als auch bei 25 KV zielführend. Mit einer Spannung von 15 KV wurden weniger gute Ergebnisse erzielt.

Dieses Ergebnis wurde durch die Rasterelektronenmikroskopie bestätigt. Abbildung 44 zeigt repräsentative REM-Aufnahmen eines Plasmaclots mit 50% Plasma (A) und mit 75% Plasma (B) nach Polymerisation im elektrischen Feld mit einer Spannung von 20 KV. Die Längsorientierung der Fibrinfasern ist hier deutlich zu erkennen.

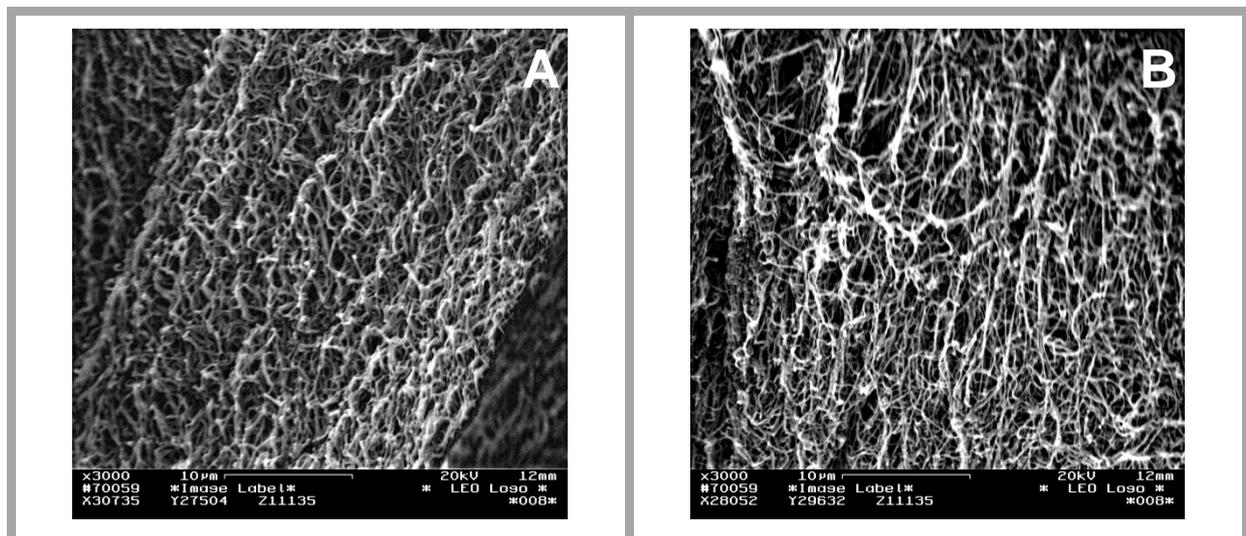


Abb. 44: Repräsentative REM-Aufnahmen eines Plasmaclots mit 50% Plasma (A) sowie 75% Plasma (B) nach Koagulation im elektrischen Feld mit einer Spannung von 20 KV.

Die Ausrichtungsmethode im elektrischen Feld hatte keinen Effekt weder auf die Faserdicke von Plasmaclots mit 50% Plasma noch auf Clots mit 75% Plasma. Die Faserdicken zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (50% Plasma / 20 KV: 169 ± 14 nm; 75% Plasma / 20 KV: 157 ± 35 nm vs. 50% Plasma / Kon: 173 ± 28 nm; 75% Plasma / Kon: 151 ± 33 nm).

4.2.2 Statistische Analyse der Fibrinfaserausrichtungen im elektrischen Feld

Bei der Fibrinfaserausrichtung im elektrischen Feld zeigte der Kruskal-Wallis-Test nur bei der FWHM signifikante Unterschiede und bei der Peak Area Tendenzen zur Signifikanz (Tab.

10). Beim anschließenden Mann-Whitney-U-Test wurde als Vergleichswert 25 KV eingesetzt, der ein ausgeprägtes FWHM-Minimum sowohl bei einem Plasmaanteil von 50% als auch von 75% dokumentierte (Abb. 43). Der Mann-Whitney-U-Test ergab bei der FWHM signifikante Unterschiede zwischen dem Vergleichswert 25 KV vs. 20 KV bei beiden Gruppen (50% Plasma und 75% Plasma) und vs. 15 KV bei der Gruppe 75% Plasma. Bei der Gruppe 50% Plasma wies der Vergleich zwischen 25 KV und 15 KV mit $p=0,056$ eine Tendenz zur Signifikanz auf.

Die statistische Analyse bestätigte daher, dass bei einer Spannung von 25 KV im Vergleich zu 15 KV und 20 KV der signifikant niedrigste FWHM-Wert erzielt wurde.

Tab. 10: Statistische Analyse (p-Werte) der FWHM und Peak Areas nach Fibrinfaserausrichtung im elektrischen Feld mit unterschiedlicher Spannung (15 KV, 20 KV, 25 KV). Gruppenanalysen (Plasmaanteil: 50% bzw. 75%) wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test, bei Signifikanz Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei den Einzelvergleichen wurden FWHM- bzw. Peak Area-Werte, die bei einer Spannung von 25 KV erzielt wurden, als Vergleichswert eingesetzt.

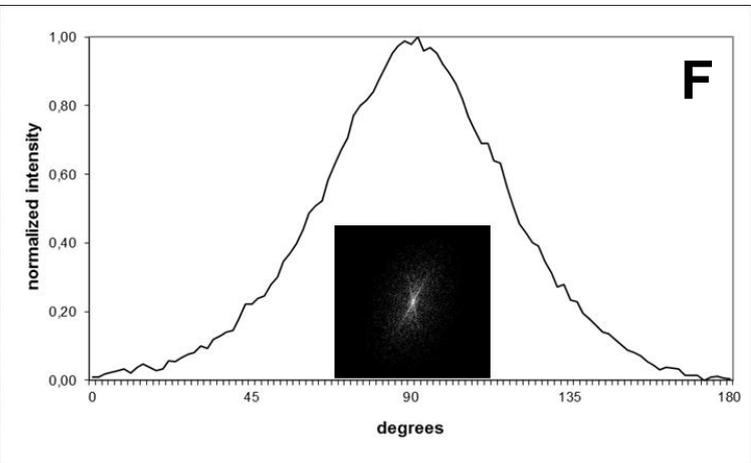
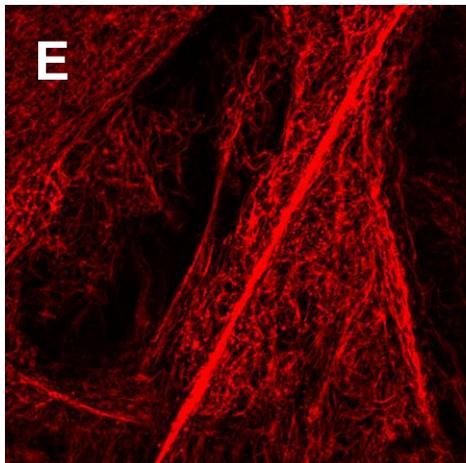
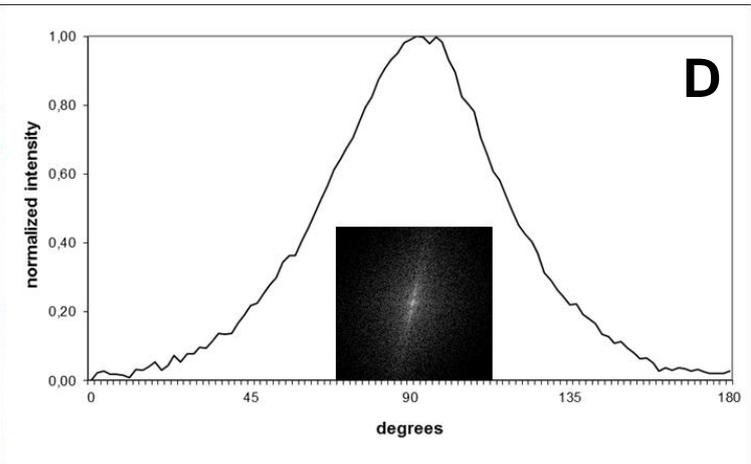
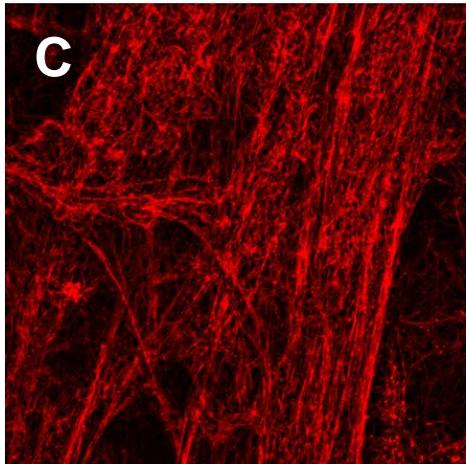
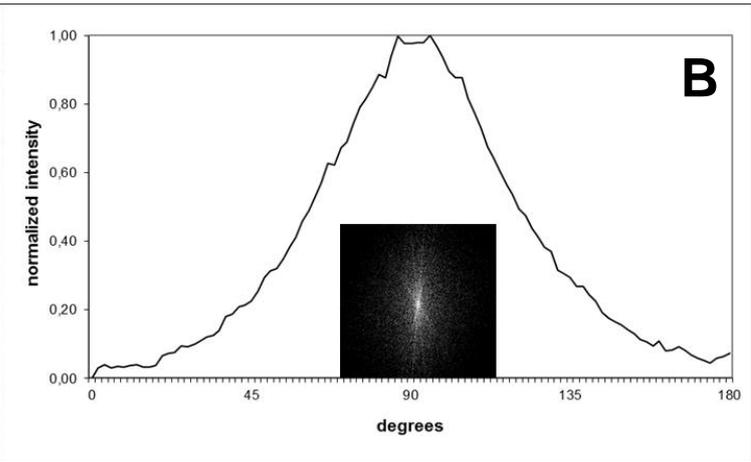
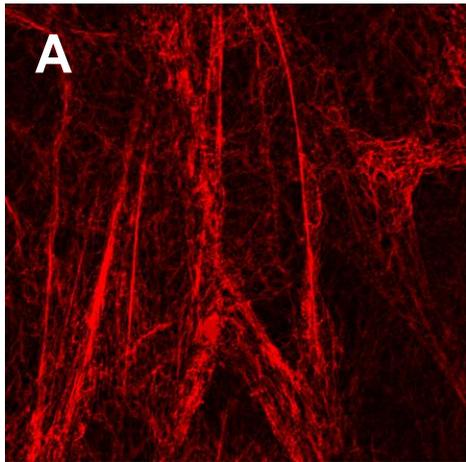
	FWHM		Peak Area	
	50%	75%	50%	75%
Plasma				
Kruskal-Wallis	$p<0,05$	$p<0,005$	$p=0,066$	$p=0,056$
U-Test	25 KV			
15 KV	$p=0,056$	$p<0,005$	$p<0,05$	$p<0,005$
20 KV	$p<0,05$	$p<0,005$	$p=0,06$	N / S
25 KV	————	————	————	————

4.3 Clot-Polymerisation unter Flow im elektrischen Feld

4.3.1 LSM-Analyse der Fibrinfaserausrichtungen

Bei der Clot-Polymerisation unter Flow im elektrischen Feld wurde die Ausrichtungsmethode unter Flow auf dem Wippschüttler mit der im elektrischen Feld zu einer neuen Methode kombiniert.

Die entstandenen Fibrinfaserausrichtungen wurden ebenfalls mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert und die resultierenden Aufnahmen wurden mit der Fast Fourier Transformation (FFT) ausgewertet (Abb. 45 und 46). Die quantitative Analyse der FFT basiert auch hier aus der Berechnung der Halbwertsbreite (Full Width at Half Maximum, FWHM) und der Peak Area X_{\min} to X_{\max} sowie des Alignment Indexes (Abb. 47).



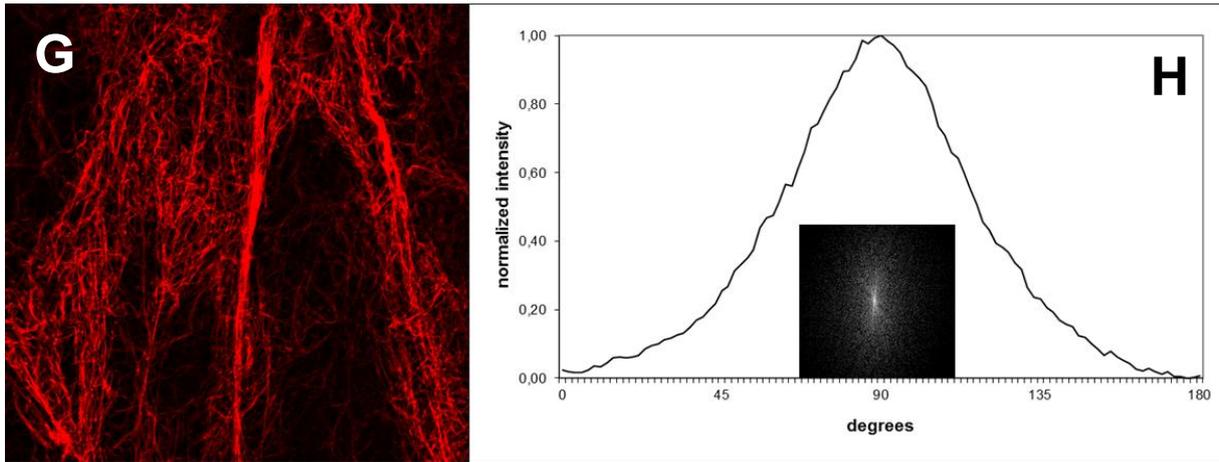
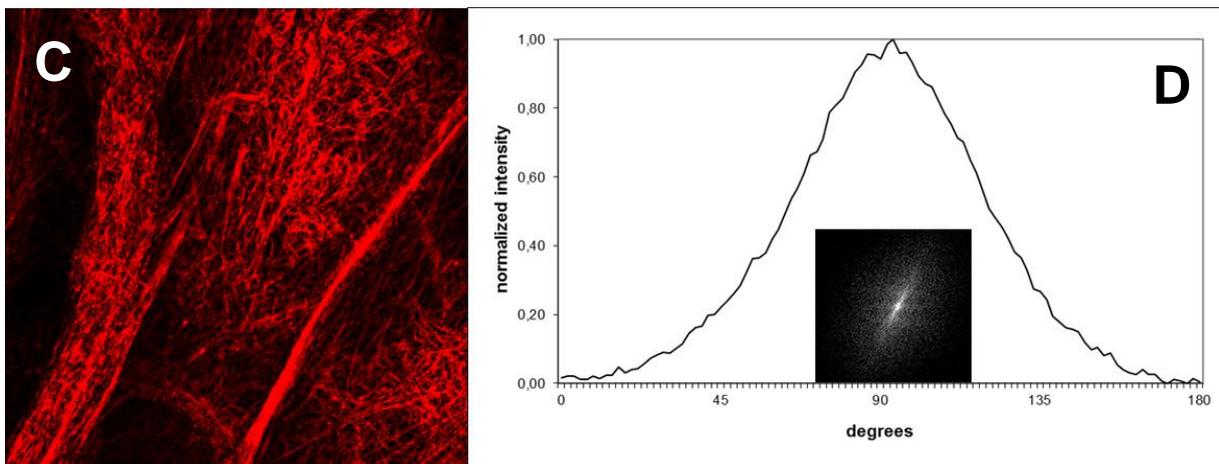
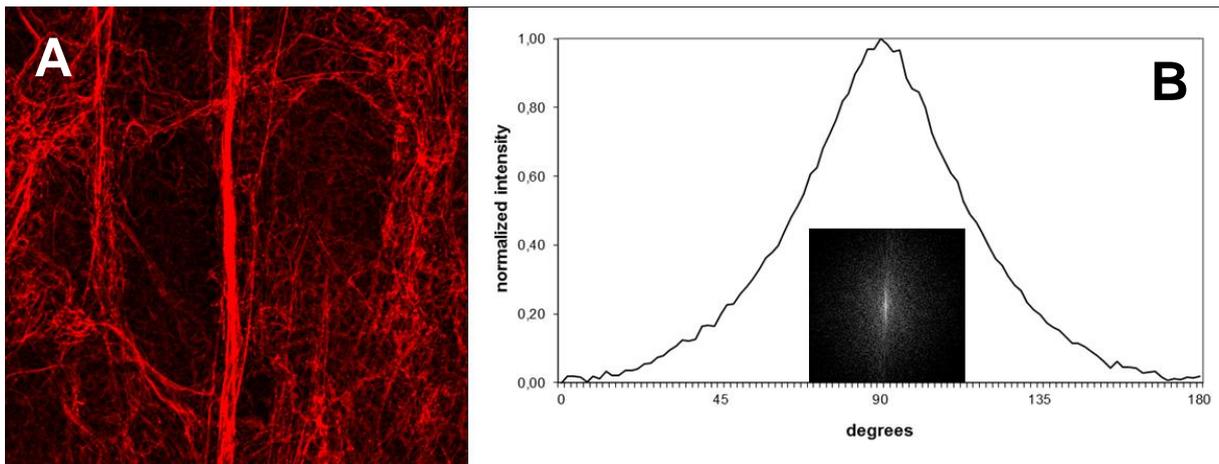


Abb. 45: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots von Plasmaclots nach Polymerisation unter Flow auf dem Wippschüttler (50 rpm (A, B), 60 rpm (C, D), 70 rpm (E, F) und 80 rpm (G, H)) im elektrischen Feld mit einer Stromspannung von 25 KV. Plasmaclots wurden mit einem Plasmaanteil von 50% hergestellt.



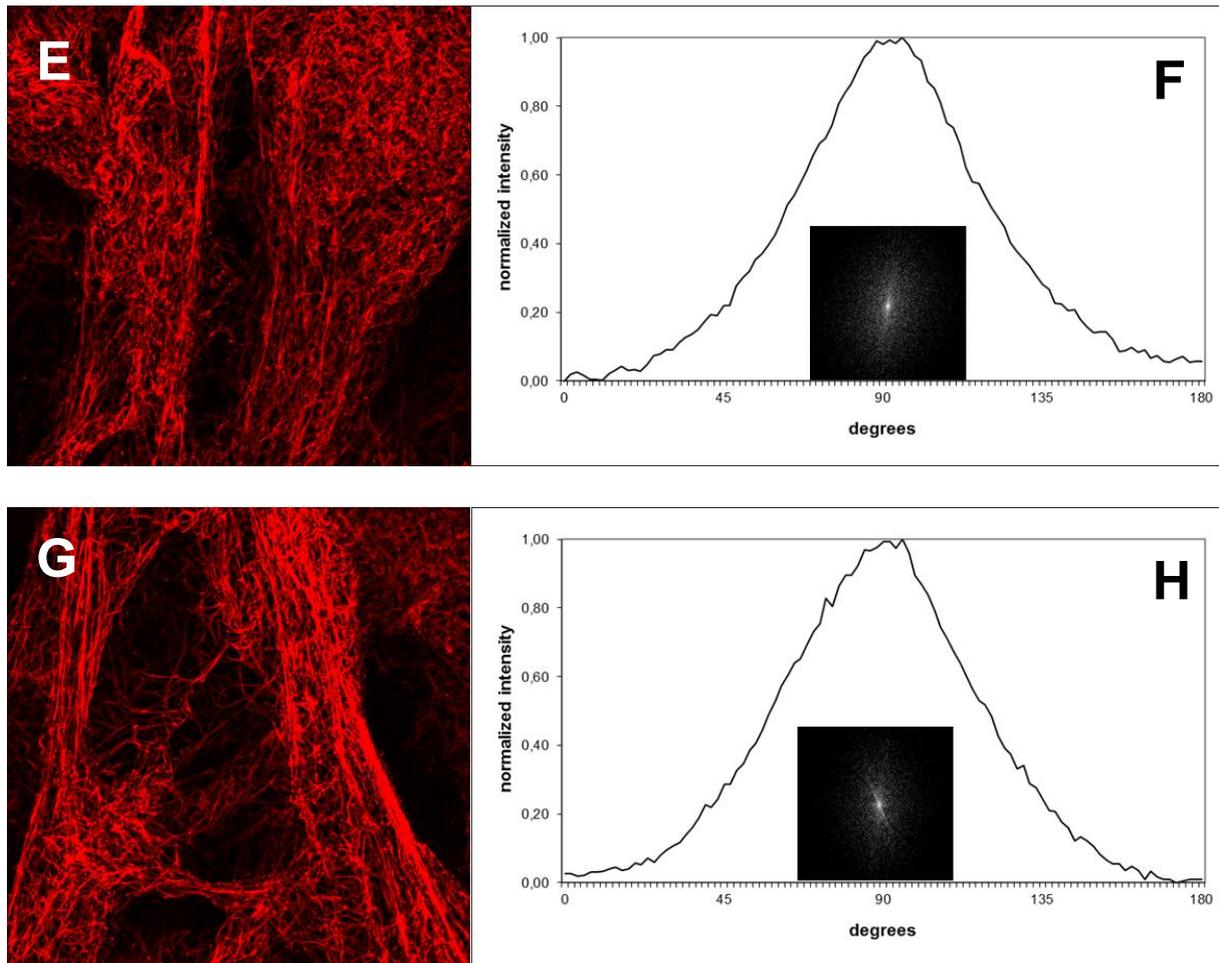


Abb. 46: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots von Plasmaclots nach Polymerisation unter Flow auf dem Wippschüttler (50 rpm (A, B), 60 rpm (C, D), 70 rpm (E, F) und 80 rpm (G, H)) im elektrischen Feld mit einer Stromspannung von 25 KV. Plasmaclots wurden mit einem Plasmaanteil von 75% hergestellt.

Die Laser-Scanning-Aufnahmen demonstrieren, dass bei dieser Ausrichtungsmethode die Flow-Bewegung dominierte. Plasmaclots bestanden hier hauptsächlich wie bei Verwendung des Wippschüttlers ohne Strom aus gerichteten großen Faserbündeln, die durch dünne Fasern verbunden waren (Abb. 45A, C, E, G und Abb. 46A, C, E, G).

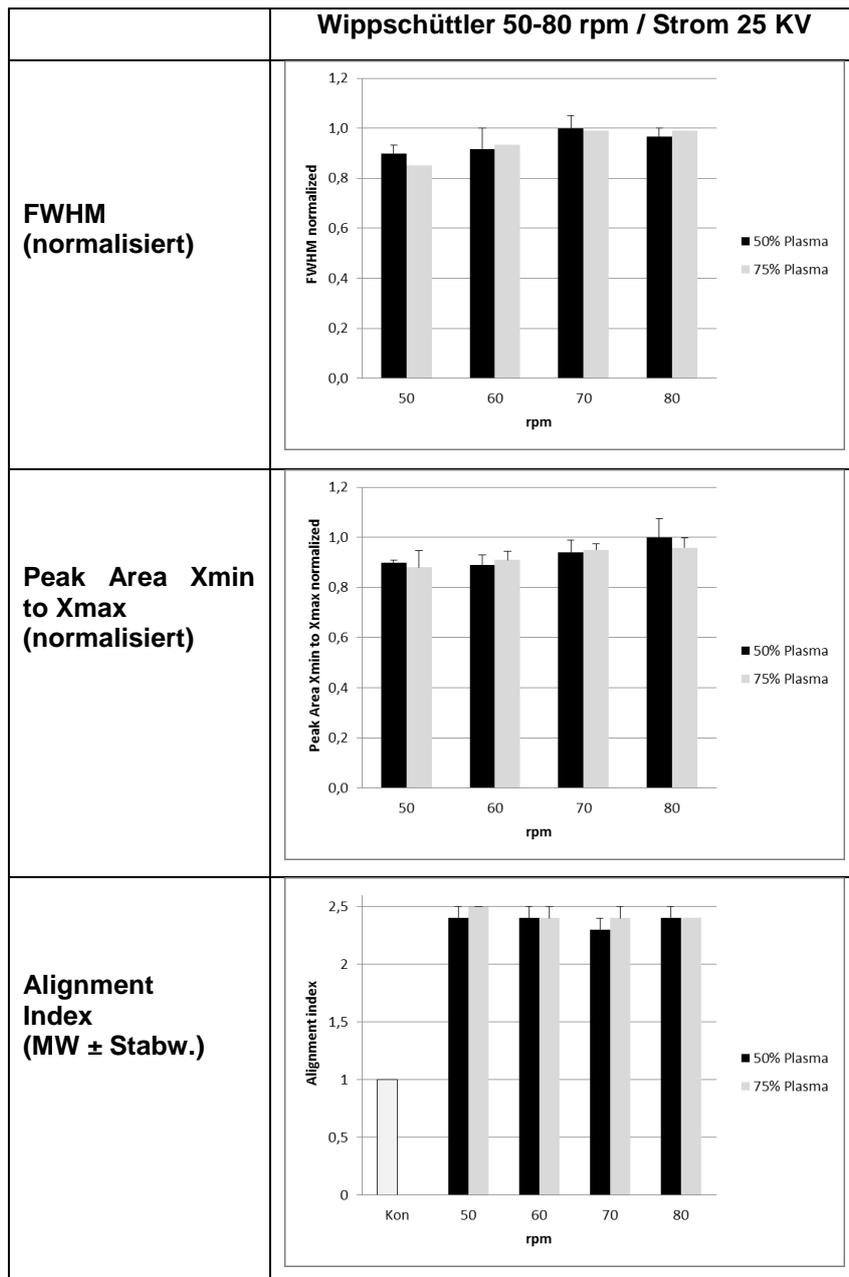


Abb. 47: Auswertung der FFT-Analyse. Graphische Darstellung der FWHM und Peak Area Xmin to Xmax nach Normalisierung der Daten sowie des Alignment Indexes in Abhängigkeit von der Wippschüttlergeschwindigkeit.

Die minimale FWHM lag sowohl für Plasmaclots mit 50% Plasma als auch mit 75% Plasma bei einer Wippschüttlerbewegung von 50 rpm (50% Plasma: 0,9000; 75% Plasma: 0,8500) (Abb. 47). Die minimale Peak Area zeigte sich für Plasmaclots mit 50% Plasma bei einer Wippschüttlerbewegung von 60 rpm (0,8882) sowie mit 75% Plasma bei 50 rpm (0,8795) (Abb. 47). Der höchste Alignment Index lag sowohl für Clots mit 50% Plasma als auch mit 75% Plasma bei einer Wippschüttlerbewegung von 50 rpm (50% Plasma: 2,4 ± 0,1; 75% Plasma: 2,5 ± 0,1) (Abb. 47).

Diese Ergebnisse zeigten ein ähnliches Resultat wie vergleichbare Experimente auf dem Wippschüttler ohne Verwendung von Hochspannung. Die Kombination von Flow und Strom erreichte keine weitere Steigerung der Fibrinfaserausrichtung, was den potentiellen Nutzen dieser Ausrichtungsmethode stark einschränkt.

4.3.2 Statistische Analyse der Fibrinfaserausrichtungen unter Flow im elektrischen Feld

Bei der Fibrinfaserausrichtung unter Flow im elektrischen Feld zeigte der Kruskal-Wallis-Test bei der FWHM für beide Plasmaanteile und bei der Peak Area nur bei der Gruppe 50% Plasma signifikante Unterschiede (Tab. 11). Beim anschließenden Mann-Whitney-U-Test wurde als Vergleichswert 50 rpm eingesetzt, der ein ausgeprägtes FWHM-Minimum sowohl bei einem Plasmaanteil von 50% als auch von 75% dokumentierte (Abb. 47). Der Mann-Whitney-U-Test ergab bei der FWHM signifikante Unterschiede zwischen dem Vergleichswert 50 rpm vs. 70 rpm und 80 rpm bei beiden Gruppen (50% Plasma und 75% Plasma). Dagegen zeigte sich keine Signifikanz zwischen 50 rpm und 60 rpm bei beiden Gruppen (50% und 75% Plasmaanteil).

Beim Vergleich der Peak Areas mittels Mann-Whitney-U-Test wurde ersichtlich, dass sich der Vergleichswert 50 rpm nur von 80 rpm bei der Gruppe 50% Plasma signifikant unterschied (Tab. 11). Dagegen zeigte sich keine Signifikanz zwischen dem Vergleichswert 50 rpm und 60 rpm sowie 70 rpm. Die statistische Analyse bestätigte, dass bei einer Wippgeschwindigkeit von 50 rpm in Kombination mit einer Spannung von 25 KV der tendenziell signifikant niedrigste FWHM-Wert erzielt wurde.

Tab. 11: Statistische Analyse (p-Werte) der FWHM und Peak Areas nach Fibrinfaserausrichtung unter Flow auf dem Wippschüttler (50 rpm, 60 rpm, 70 rpm und 80 rpm) im elektrischen Feld mit einer gleichbleibenden Stromspannung von 25 KV. Gruppenanalysen (Plasmaanteil: 50% bzw. 75%) wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test, bei Signifikanz Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei den Einzelvergleichen wurden FWHM- bzw. Peak Area-Werte, die bei einer Wippgeschwindigkeit von 50 rpm erzielt wurden, als Vergleichswert eingesetzt.

	FWHM		Peak Area	
	50%	75%	50%	75%
Kruskal-Wallis	p<0,05	p<0,005	p<0,05	N / S
U-Test	50 rpm			
50 rpm	————	————	————	————
60 rpm	N / S	N / S	N / S	N / S
70 rpm	p<0,05	p<0,05	N / S	N / S
80 rpm	p<0,05	p<0,005	p<0,05	p=0,065

4.4 Statistische Gesamt-Analyse der unterschiedlichen Fibrinfaserausrichtungen

Für den Vergleich der unterschiedlichen Ausrichtungsmethoden wurden nur Werte der Parameter eingesetzt, bei denen die jeweilige Methode die niedrigsten FWHM-Werte zeigte. Der Kruskal-Wallis-Test war sowohl bei der FWHM als auch bei der Peak Area für beide Plasmaanteile signifikant (Tab. 12). Die Einzelvergleiche der FWHM beider Plasmaanteile (50% und 75%) ergaben im anschließenden Mann-Whitney-U-Test signifikante Unterschiede zwischen Wippschüttler, elektrischem Feld und elektrischem Feld auf dem Wippschüttler gegenüber dem Horizontalschüttler. Da die FWHM-Werte dieser drei Ausrichtungsmethoden alle niedriger als die des Horizontalschüttlers waren, sind folglich die Werte signifikant niedriger. Die drei Ausrichtungsmethoden waren jedoch untereinander nicht signifikant unterschiedlich.

Im Vergleich der Peak Areas mittels Mann-Whitney-U-Test zeigte die Ausrichtungsmethode auf dem Wippschüttler bei der Gruppe mit 50% Plasmaanteil gegenüber alle anderen Methoden den signifikant niedrigsten Wert (Tab. 12). Darauf folgte das elektrische Feld mit dem nächst niedrigem Wert, der ebenfalls signifikant zu den Ausrichtungsmethoden auf dem Horizontalschüttler sowie im elektrischen Feld in Kombination mit dem Wippschüttler war. Die höchsten Peak Area-Werte wiesen folglich der Horizontalschüttler und das elektrische Feld in Kombination mit dem Wippschüttler auf, die untereinander nicht signifikant unterschiedlich waren.

Bei den Peak Areas von der Gruppe mit 75% Plasmaanteil waren die gleichen Signifikanzen wie bei der Gruppe mit 50% Plasmaanteil zu beobachten, mit dem Unterschied, dass das elektrische Feld nicht signifikant vs. der Kombination aus elektrischem Feld und Wippschüttler war.

Tab. 12: Statistische Analyse (p-Werte) der unterschiedlichen Ausrichtungsmethoden. Gruppenanalysen (Plasmaanteil: 50% bzw. 75%) wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test, bei Signifikanz Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei den Einzelvergleichen wurden nur Werte der Parameter betrachtet, bei denen die jeweilige Methode die niedrigsten FWHM-Werte zeigte. Verglichen wurden die Ausrichtung auf dem Wippschüttler bei 50 rpm (W 50), auf dem Horizontalschüttler bei 60 rpm (H 60), im elektrischen Feld bei 25 KV (E 25) und im elektrischen Feld auf dem Wippschüttler bei 50 rpm und 25 KV (W 50 + E25).

	FWHM							
Plasma	50%				75%			
Kruskal-Wallis-Test	p<0,05				p<0,05			
U-Test	W 50	H 50	E 25	W 50 + E 25	W 50	H 50	E 25	W 50 + E 25
W 50	-----	p<0,05	N / S	p=0,053	-----	p<0,05	N / S	N / S
H 60	p<0,05	-----	p<0,05	p<0,05	p<0,05	-----	p<0,05	p<0,05
E 25	N / S	p<0,05	-----	N / S	N / S	p<0,05	-----	N / S
W50 + E 25	p=0,053	p<0,05	N / S	-----	N / S	p<0,05	N / S	-----
	Peak Area							
Kruskal-Wallis-Test	p<0,001				p<0,005			
U-Test	W 50	H 50	E 25	W 50 + E 25	W 50	H 50	E 25	W 50 + E 25
W 50	-----	p<0,05	p<0,05	p<0,005	-----	p<0,05	p<0,005	p<0,005
H 60	p<0,05	-----	p<0,05	N / S	p<0,05	-----	p<0,05	N / S
E 25	p<0,05	p<0,05	-----	p<0,05	p<0,005	p<0,05	-----	N / S
W50 + E 25	p<0,005	N / S	p<0,05	-----	p<0,005	N / S	N / S	-----

4.4.5 Nervenleitschienen-Modelle

4.5.1 Optimierung der Nervenleitschienen-Modelle: Verklebung

Der niedrig viskose Schwanheimer Industriekleber erwies sich für die Verklebung des Deckglases auf die Unterseite des Nervenleitschienen-Modells als weniger gut geeignet, da die Verarbeitungszeit beschränkt war. Der vergleichsweise schnelle unter Luftfeuchtigkeit und Druck spontan einsetzende Polymerisationsprozess des Klebers hatte zur Folge, dass bei einem flächigen Auftrag ein gleichzeitiges und gleichmäßiges Einwirken der Klebstofflösung auf die gesamten Flächen nicht gewährleistet war und so Fehlverklebungen zustande kamen. Die Verklebungen lösten sich, insbesondere an den runden Kanten der Leitschienen und an Stellen mit Spannungen von dem Deckglas ab.

Beim Schwanheimer Industriekleber Gel war aufgrund der höheren Viskosität eine kurzzeitige Korrektur der Verklebung möglich. Im Vergleich zum Schwanheimer Industriekleber härtete er etwas langsamer aus. Desweiteren unterschied er sich durch eine restelastische / flexible Aushärtung.

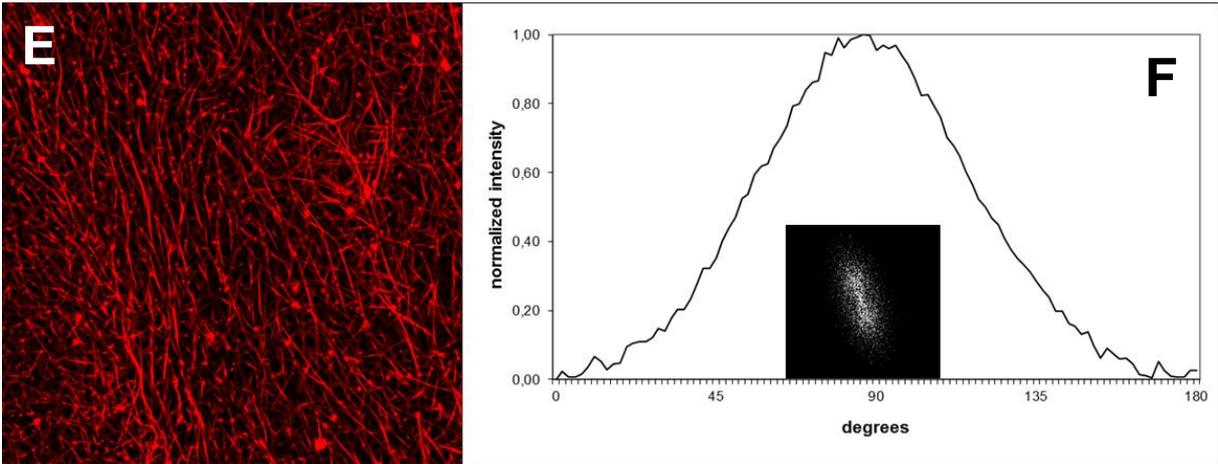
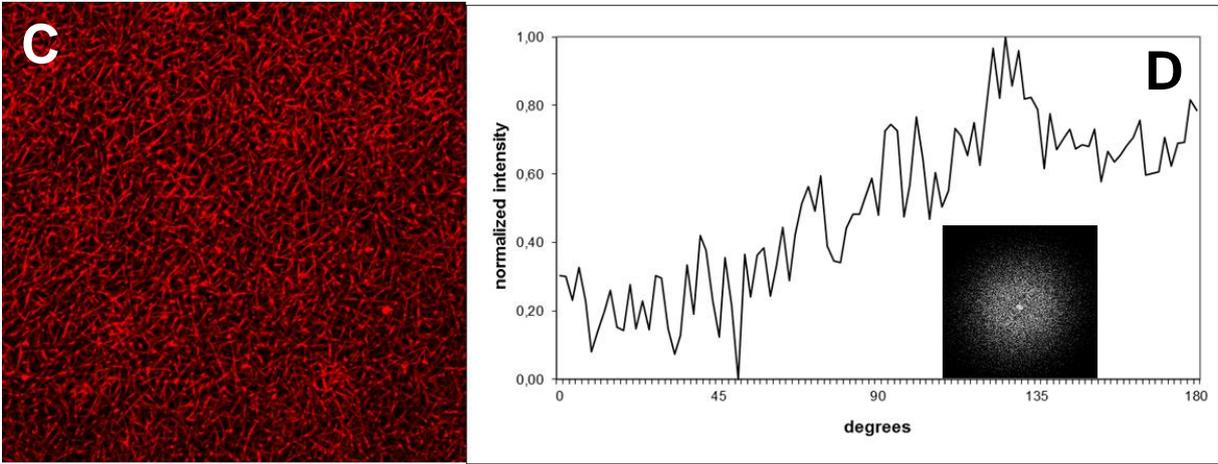
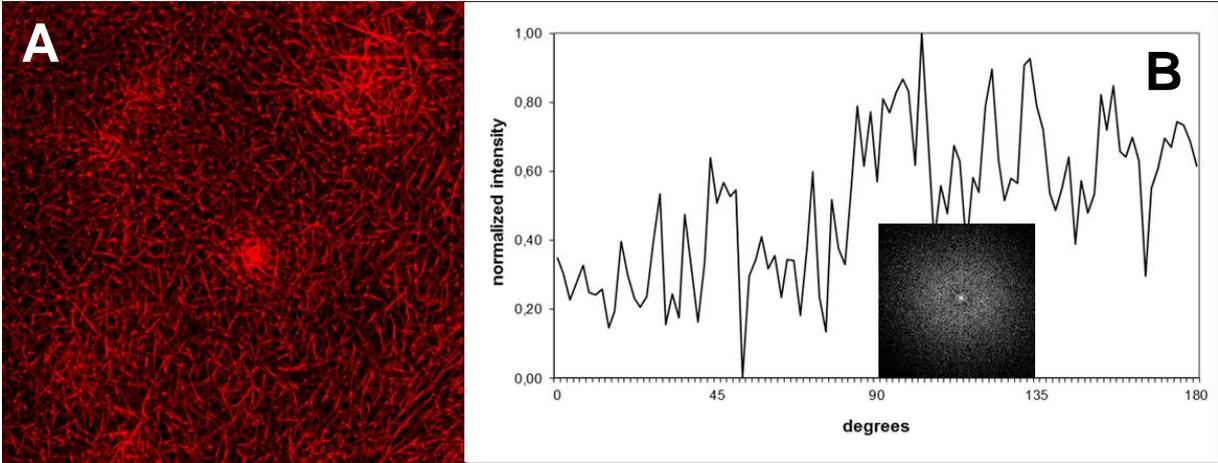
Beide Klebstoffe waren nicht geeignet, da für den großflächigen Auftrag die Zeit zu gering war und daher bereits vor der Deckglasfixierung der Polymerisationsprozess begonnen hatte, was zu einer verringerten Festigkeit der Kleber führte. Unter Versuchsbedingungen bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank und bei einer dauerhaften Flüssigkeitsbelastung der Klebstoffe sank die Beständigkeit sowohl beim Schwanheimer Industriekleber als auch beim Schwanheimer Industriekleber Gel rapide ab.

Loctite AA 3311 und Loctite AA 3494 konnte mittels Kartusche und eines Pinsels dünn und gleichmäßig auf die Flächen aufgetragen werden. Dies ermöglichte eine saubere und exakte Verarbeitung. Eine nachträgliche Korrektur der Verklebung war bei beiden Klebern möglich, da die Polymerisation erst durch UV-Strahlung initiiert wurde. Die abschließenden Eigenschaftsprüfungen der resultierenden Verklebungen unter Versuchsbedingungen (37°C im Brutschrank, dauerhafte Flüssigkeitsbelastung) konnten eine weitgehende Aussage über das Verhalten der beiden Klebstoffe im praktischen Einsatz geben. Sie zeigten, dass beide Klebstoffe für die Verklebung des Nervenleitschienen-Modells mit einem Deckglas geeignet waren. Für die endgültige Verklebung wurde allerdings nur Loctite AA 3494 eingesetzt, da die Verarbeitung durch die höhere Viskosität des Klebstoffs erleichtert wurde.

4.5.2 Clot-Polymerisation unter Flow-Bedingungen im Nervenleitschienen-Modell

In diesem Modell wurden ursprünglich ungerichtete Fibrinfasern bereits beim Clottingprozess unter Flow-Bedingungen ausgerichtet. Anschließend wurden die entstandenen Fibrinfaser-ausrichtungen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert und die

resultierenden Aufnahmen mit der Fast Fourier Transformation (FFT) ausgewertet (Abb. 48 und 49).



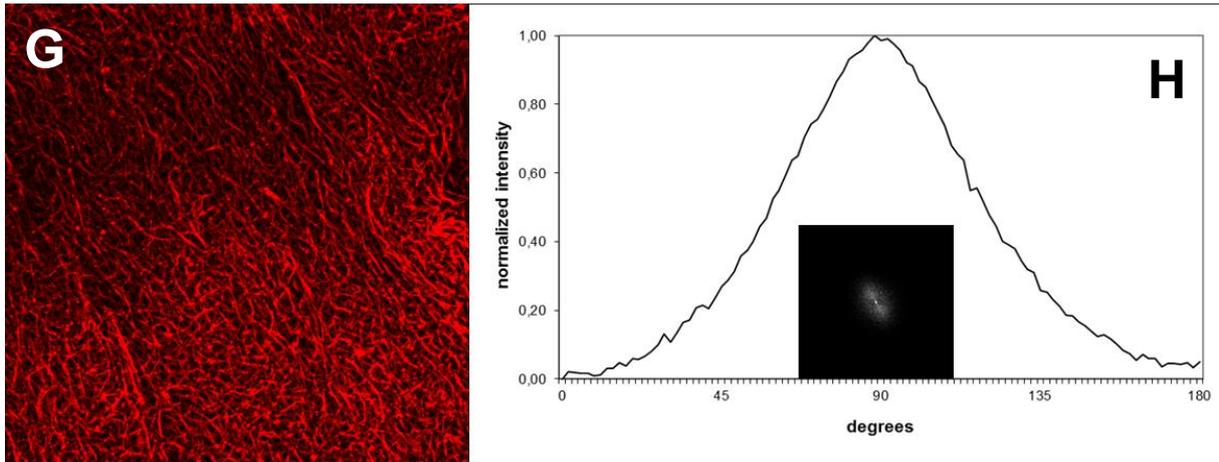
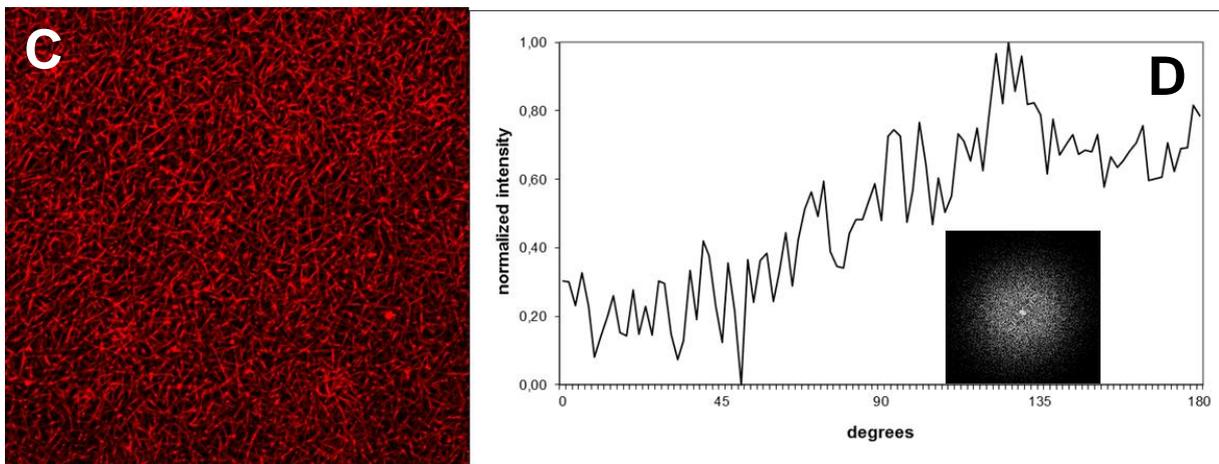
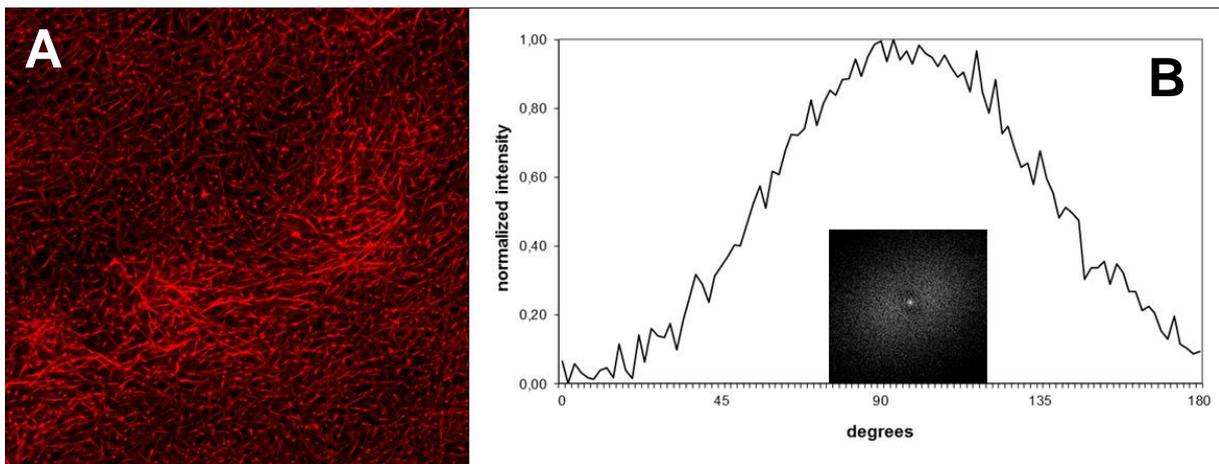


Abb. 48: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen (A, C, E und G) sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots eines Plasmaclots nach Polymerisierung auf dem Wippschüttler mit einer Wippbewegung von 50 rpm (A und B), 60 rpm (C und D), 70 rpm (E und F) bzw. 80 rpm (G und H) im Leitschienenmodell. Plasmaclots wurden mit einem Plasmaanteil von 50% hergestellt.



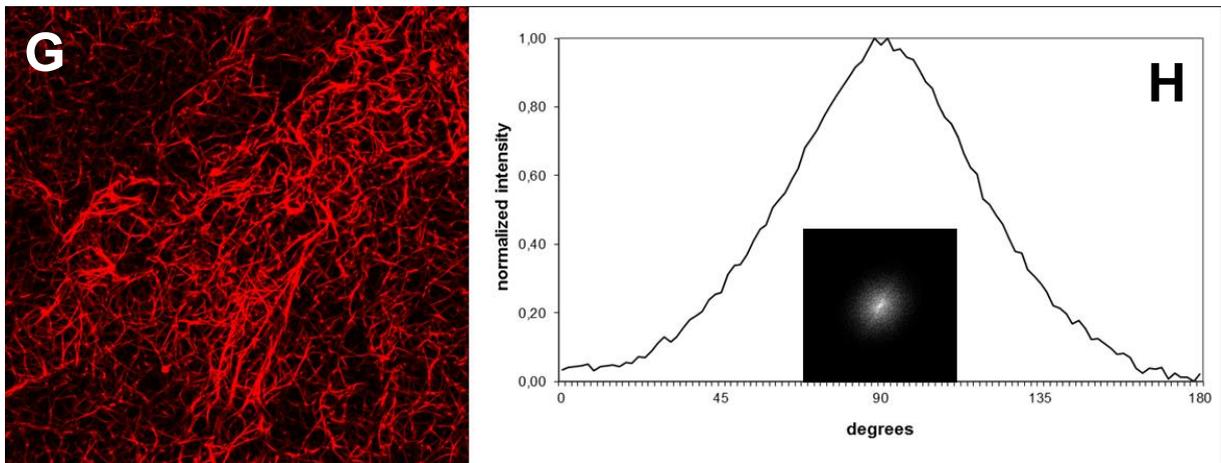
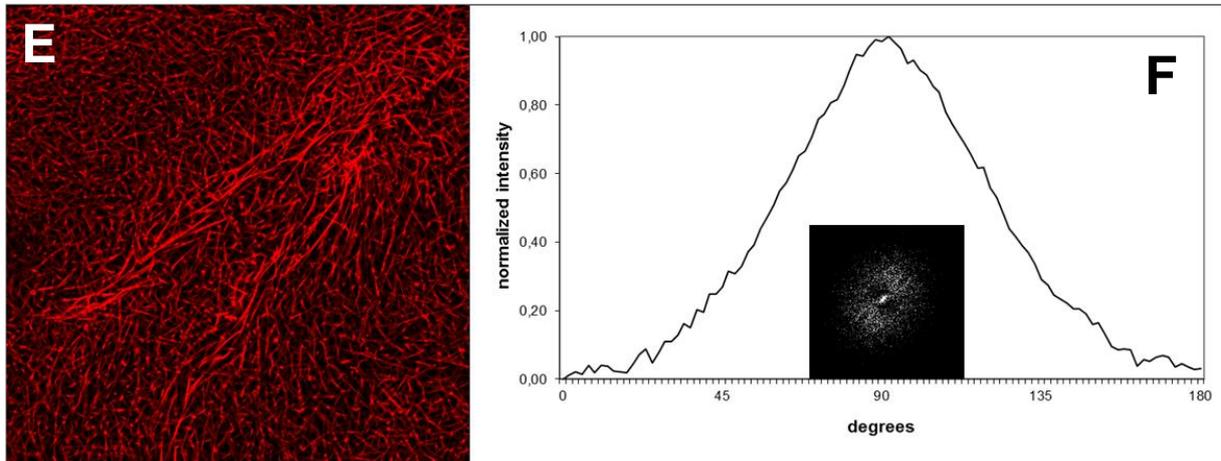


Abb. 49: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen (A, C, E und G) sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots eines Plasmaclots nach Polymerisierung auf dem Wippschüttler mit einer Wippbewegung von 50 rpm (A und B), 60 rpm (C und D), 70 rpm (E und F) bzw. 80 rpm (G und H) im Leitschienenmodell. Plasmaclots wurden mit einem Plasmaanteil von 75% hergestellt.

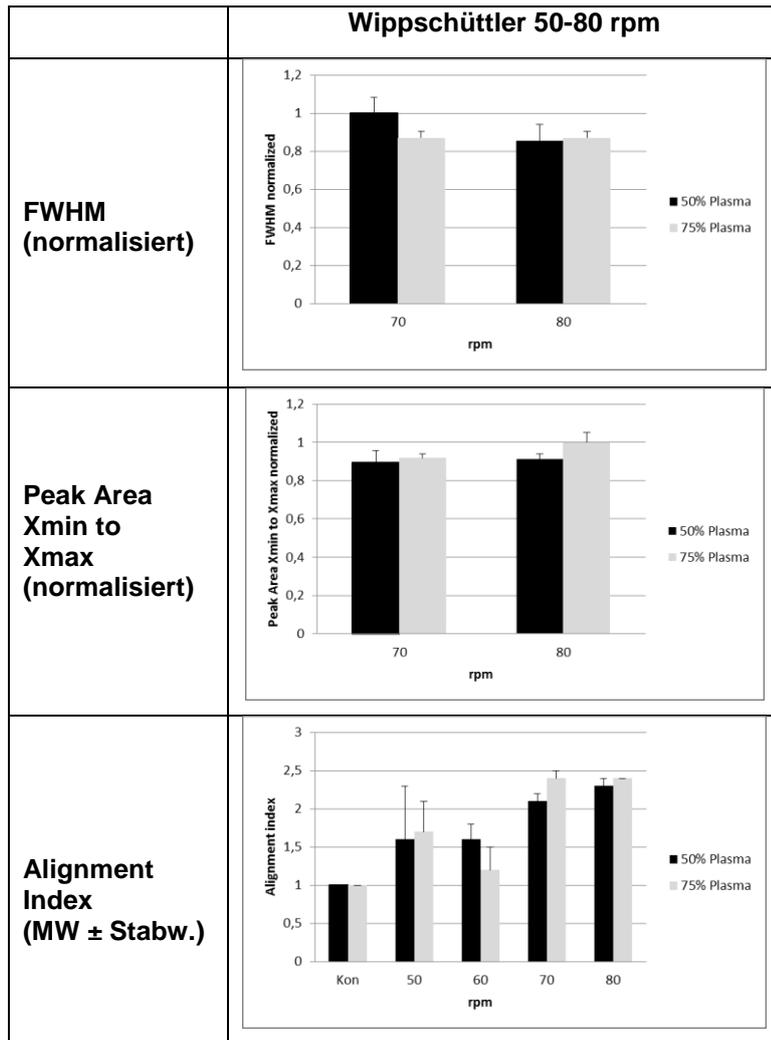


Abb. 50: Auswertung der FFT-Analyse. Graphische Darstellung der FWHM und Peak Area Xmin to Xmax nach Normalisierung der Daten sowie des Alignment Indexes in Abhängigkeit von der Flow-Bewegung.

Die Laser-Scanning-Aufnahmen zeigten, dass eine Längsorientierung der Fibrinfasern von Plasmaclots sowohl mit einem Plasmagehalt von 50% (Abb. 48) als auch mit 75% Plasma (Abb. 49) in den Leitschienen nur bei einer Wippbewegung von 70 rpm und 80 rpm erreicht wurde. Bei 50 rpm und 60 rpm blieben ca. 80-90% der Fasern ungerichtet.

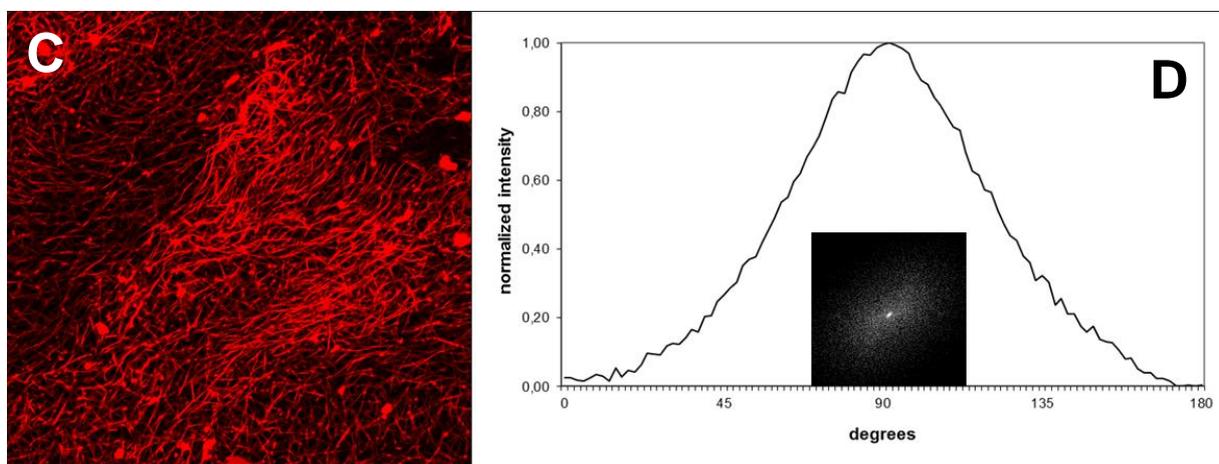
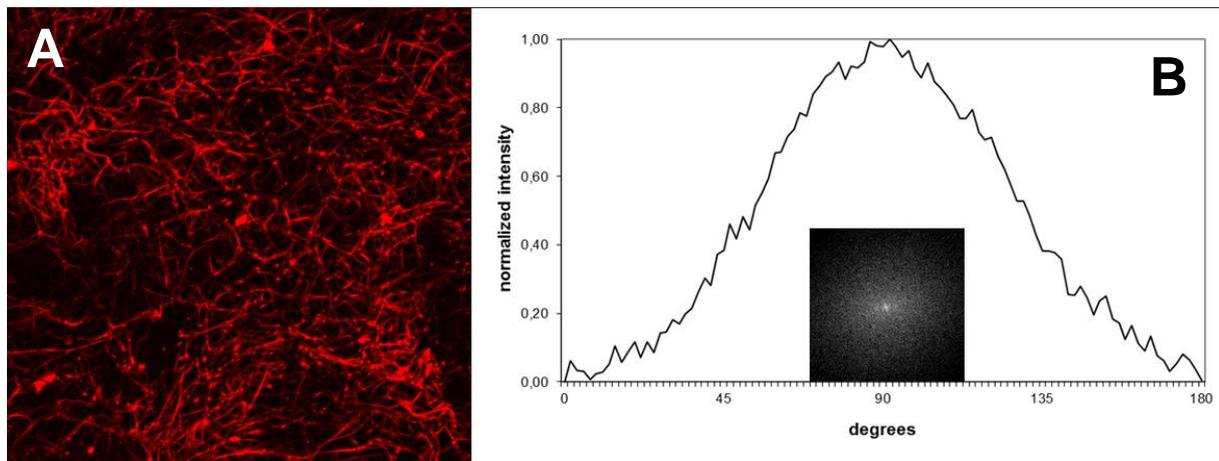
Um die Abhängigkeit der Fibrinfaserausrichtung von der Wippbewegung (50 – 80 rpm) genauer zu untersuchen, wurden die Halbwertsbreite FWHM und die Peak Area Xmin to Xmax der FFT-Peaks sowie der Alignment Index berechnet. Nach Normalisierung der Daten (FWHM bzw. Peak Area) wurden diese Parameter in Abhängigkeit von der Flow-Bewegung jeweils in einem Diagramm aufgetragen und in Abbildung 50 zusammengefasst. Die minimale FWHM war sowohl für Plasmaclots mit 50% Plasma als auch mit 75% Plasma bei einer Wippbewegung von 80 rpm (50% Plasma: 0,8571; 75% Plasma: 0,8714) zu finden.

Der höchste Alignment Index lag bei einer Wippbewegung von 80 rpm sowohl für Clots mit 50% Plasma ($2,3 \pm 0,1$) als auch mit 75% Plasma ($2,4 \pm 0,1$) und die minimale Peak Area bei 70 rpm (50% Plasma: 0,8959; 75% Plasma: 0,9183).

Ein ähnlicher Effekt trat bei der Clot-Polymerisation auf dem Horizontalschüttler auf. Bei Fließgeschwindigkeiten von 50 rpm – 70 rpm blieben die Clots ungerichtet, während nur eine Fließgeschwindigkeit von 80 rpm eine Längsorientierung der Fibrinfasern hervorrief. Daher wurde die Horizontalbewegung in 10er-Schritten bis auf 120 rpm erhöht (Abb. 51).

Die minimale FWHM lag danach bei Plasmaclots mit 50% Plasma bei einer Horizontalgeschwindigkeit von 120 rpm (0,8178) und mit 75% Plasma bei 110 rpm (0,8178).

Die Werte der FWHM-Minima zeigten deutlich, dass die Längsorientierung der Fibrinfasern nach Erhöhung der Geschwindigkeit stärker ausgebildet wurde (Abb. 52).



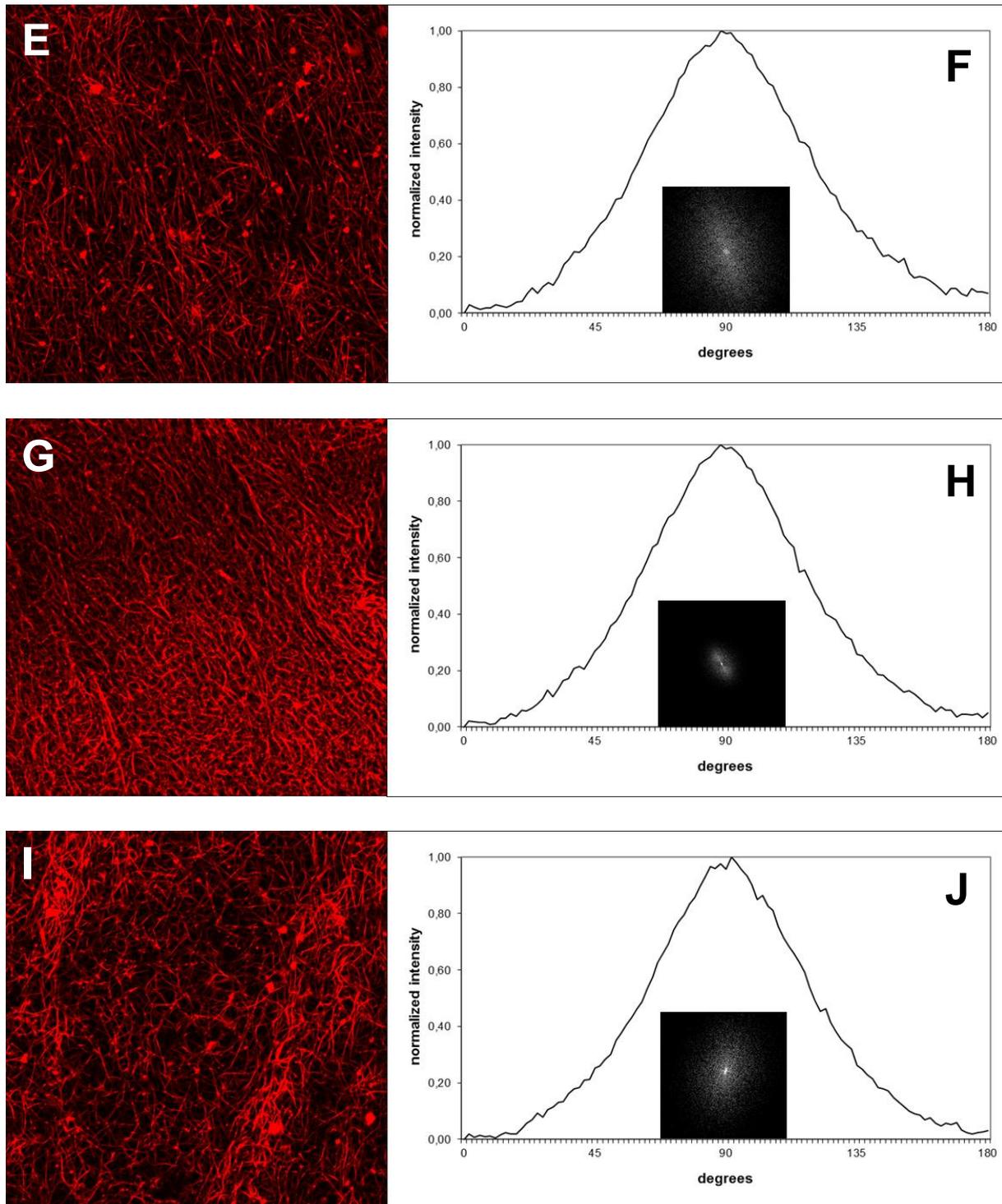


Abb. 51: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen (A, C, E und G) sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots eines Plasmaclots nach Polymerisierung auf dem Horizontalschüttler mit einer Horizontalbewegung von 80 rpm (A und B), 90 rpm (C und D), 100 rpm (E und F), 110 rpm (G und H) bzw. 120 rpm (I und J) im Leitschienenmodell. Plasmaclots wurden mit einem Plasmaanteil von 50% hergestellt.

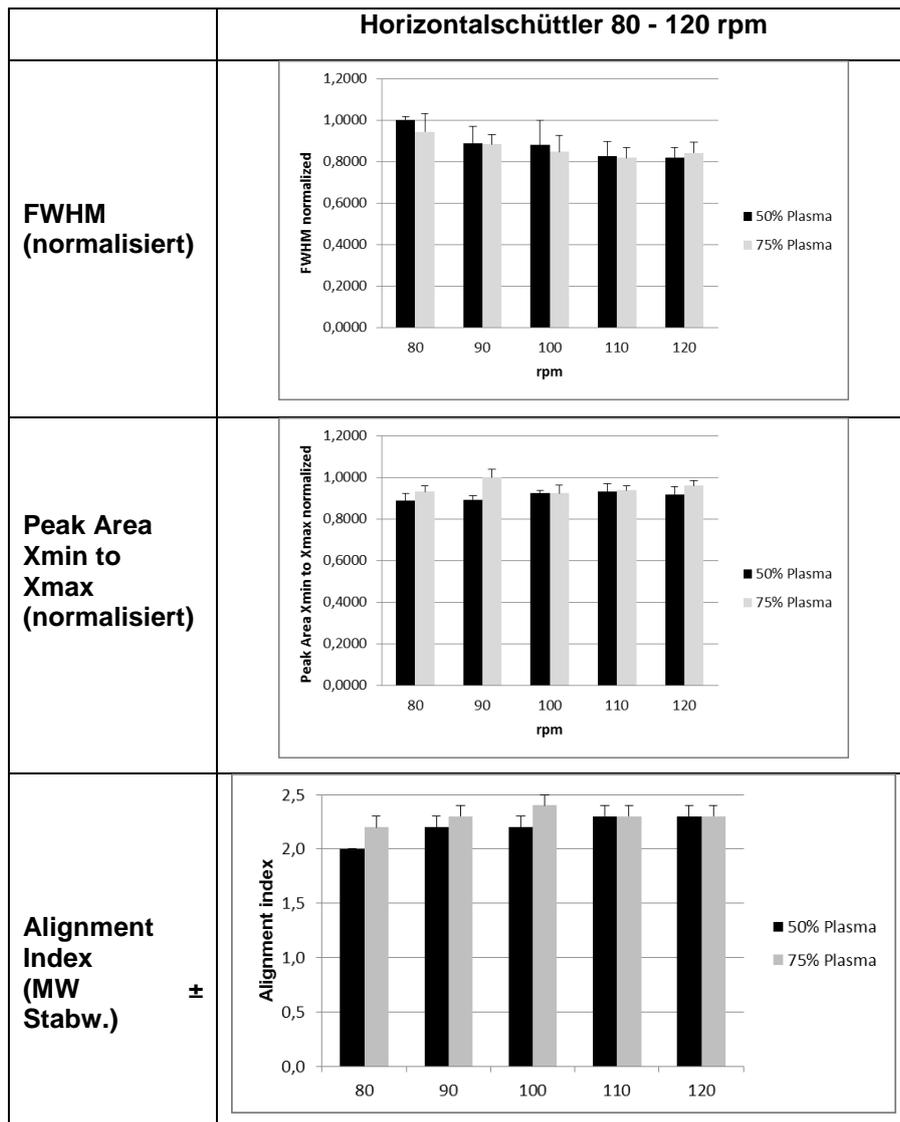


Abb. 52: Auswertung der FFT-Analyse von Plasma-clots, hergestellt mit 50% Plasma bzw. 75% Plasma, nach Polymerisation auf dem Horizontalschüttler (80 – 120 rpm) in Leitschienen. Graphische Darstellung der FWHM und Peak Area Xmin to Xmax nach Normalisierung der Daten sowie des Alignment Indexes in Abhängigkeit von der Horizontal-Bewegung.

Der Vergleich der Fibrinfaserorientierung zwischen der Clot-Koagulation in Leitschiene und Zweikammer-Objektträger auf dem Wipp- bzw. Horizontalschüttler verdeutlichte, dass nicht nur die Fließgeschwindigkeit sondern auch die Breite der Kavität einen entscheidenden Einfluss auf die Faserausrichtung hatte. Im Zweikammer-Objektträger mit einer Wellbreite von 2 cm wurde die beste Faserausrichtung mit einer Wipp- bzw. Horizontalbewegung bereits bei 50 rpm und 60 rpm erzielt. In der Leitschiene konnte erst bei einer Horizontalbewegung von 110 rpm und 120 rpm eine entsprechende Faserorientierung erreicht werden.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass die Strömungsvorgänge bei den beiden fließinduzierten Ausrichtungsmethoden bei den Plasmaclots sowohl in Zweikammer-Objektträgern als auch in den selbst entwickelten Leitschienen-Modellen eine gerichtete Faserorientierung verursachten. In Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit und der Breite der jeweiligen Kavität entstand ein geschichteter Aufbau der Faserausrichtung, der sich im

Zentrum der Kavität senkrecht zur Fließrichtung ausbildete. An den Kavitätswänden wurde dagegen eine schmale ungerichtete Randschicht sichtbar (Abb. 53).

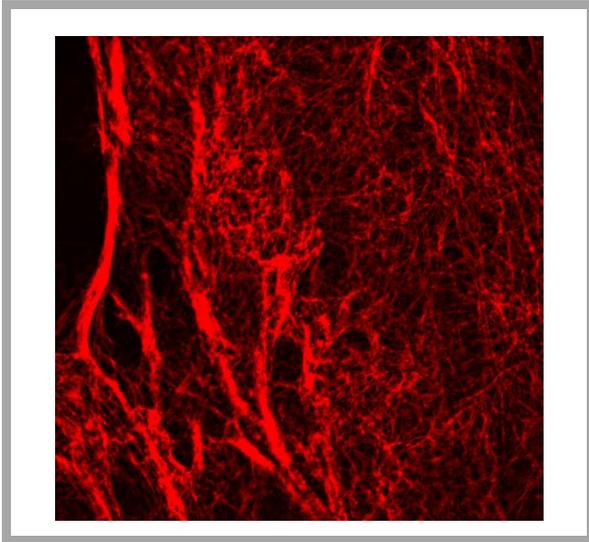


Abb. 53: Clot-Polymerisation auf dem Wippschüttler (60 rpm). Links: Zentrum der Kavität mit gerichteten Fibrinfaserbündel. Rechts: Kavitätsrand mit schmaler ungerichteter Randschicht.

Desweiteren lassen sich in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit Unterschiede im Aufbau des gerichteten Fibrinfasernetzwerkes erkennen. Bei hohen Fließgeschwindigkeiten bildeten die Fibrinfasern hauptsächlich große Faserbündel mit gerichteten Fasern, die sich stark ineinander verknäulten.

4.5.3 Statistische Analyse der Fibrinfaserausrichtungen unter Flow-Bedingungen im Nervenleitschienen-Modell und Vergleich mit 2-Well-Zellkulturkammern

Bei der Fibrinfaserausrichtung unter Flow im Nervenleitschienen-Modell zeigte der Kruskal-Wallis-Test bei der FWHM und der Peak Area signifikante Unterschiede bzw. bei der FWHM in der Gruppe 75% Plasma nur eine Tendenz zur Signifikanz mit $p=0,059$ (Tab. 13). Bei den Einzelvergleichen mittels Mann-Whitney-U-Test erwiesen sich die meisten Werte allerdings als nicht signifikant unterschiedlich. Lediglich der Vergleich zwischen 70 rpm und 80 rpm auf dem Wippschüttler war bei der FWHM mit 50% Plasmaanteil sowie der Peak Area mit 75% Plasmaanteil signifikant (Tab. 13).

Im Vergleich der jeweils niedrigsten FWHM und Peak Area der Fibrinfaserausrichtung im Leitschienenmodell (W 80 und H 120) mit denen in der 2-Well-Zellkulturkammer (W 50 und H 60) wurde gezeigt, dass nur beim Wippschüttler die Werte signifikant bzw. tendenziell unterschiedlich waren, während dies beim Horizontalschüttler nur bei der Peak Area mit 75% Plasmaanteil der Fall war. Die FWHM erzielte bei der Faserausrichtung in der 2-Well-Zellkulturkammer damit signifikant niedrigere Werte als im Nervenleitschienen-Modell.

Tab. 13: Statistische Analyse (p-Werte) der Fibrinfaserausrichtung unter Flow auf dem Wippschüttler bzw. Horizontalschüttler im Nervenleitschienen-Modell. Gruppenanalysen (Plasmaanteil: 50% bzw. 75%) wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test, bei Signifikanz Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei den Einzelvergleichen wurden die statistischen Signifikanzen der höchsten eingesetzten Geschwindigkeit des Wippschüttlers (80 rpm = W 80) und des Horizontalschüttlers (120 rpm = H 120) gegen alle anderen Geschwindigkeiten (Wippschüttler: 70 rpm (W 70); Horizontalschüttler: 80 rpm (H 80), 90 rpm (H 90), 100 rpm (H 100), 110 rpm (H 110)) getestet. Zusätzlich wurden Vergleiche zu den Faserausrichtungen auf dem Wippschüttler bei 50 rpm (W 50) und auf dem Horizontalschüttler bei 60 rpm (H 60) in den 2-Well-Zellkulturkammern durchgeführt (gelb).

	FWHM				Peak Area			
	50%		75%		50%		75%	
Plasma								
Kruskal-Wallis-Test	p<0,05		p=0,059		p<0,05		p<0,005	
U-Test	W 80	H 120	W 80	H 120	W 80	H 120	W 80	H 120
W 70	p<0,05	-----	N / S	-----	N / S	-----	p<0,005	-----
W 80	-----	N / S	-----	N / S	-----	N / S	-----	N / S
H 80	-----	p=0,057	-----	p=0,063	-----	N / S	-----	N / S
H 90	-----	N / S	-----	N / S	-----	N / S	-----	N / S
H 100	-----	N / S	-----	N / S	-----	N / S	-----	N / S
H 110	-----	N / S	-----	N / S	-----	N / S	-----	N / S
H 120	N / S	-----	N / S	-----	N / S	-----	N / S	-----
W 50	p=0,051	-----	p<0,05	-----	p<0,005	-----	p<0,05	-----
H 60	-----	N / S	-----	N / S	-----	N / S	-----	p<0,05

4.6 Clot-Polymerisation im elektrischen Feld im Leitschienen-Modell mittels Gleichstrom

4.6.1 Impedanz

Die Impedanzmessungen erfolgten sowohl mit Platin- als auch mit Gold-Elektroden. Als Beispiel wird in Abb. 54 das Impedanzspektrum von EEG-Platin-Elektroden und in Abb. 55 von Gold-Elektrodenplatten in unterschiedlichen Messlösungen gezeigt, das jeweils bei einer festen Frequenz von 200 Hz und einem Bias von 20 V über einen Zeitraum von 1 h aufgenommen wurde.

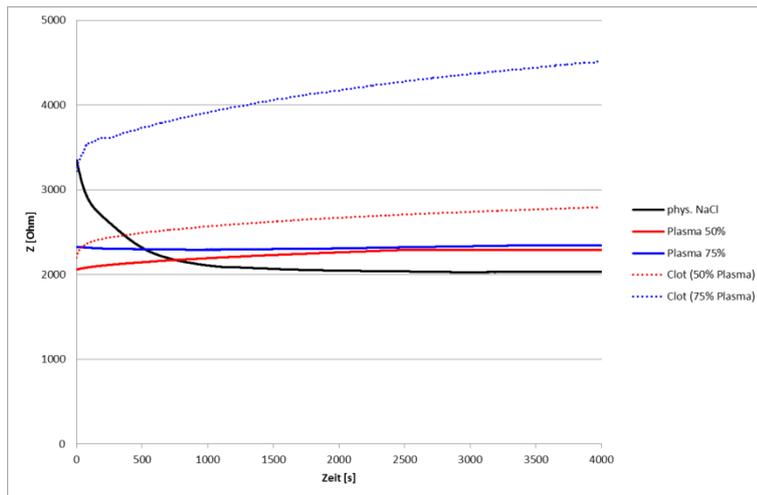


Abb. 54: Impedanzmessungen mit EEG-Platin-Nadelelektroden in unterschiedlichen Messlösungen: 0,9% NaCl-Lösung, 50% und 75% Plasma in RPMI, Plasmaclot-Gemisch mit 50% bzw. 75% Plasma und CaCl_2 .

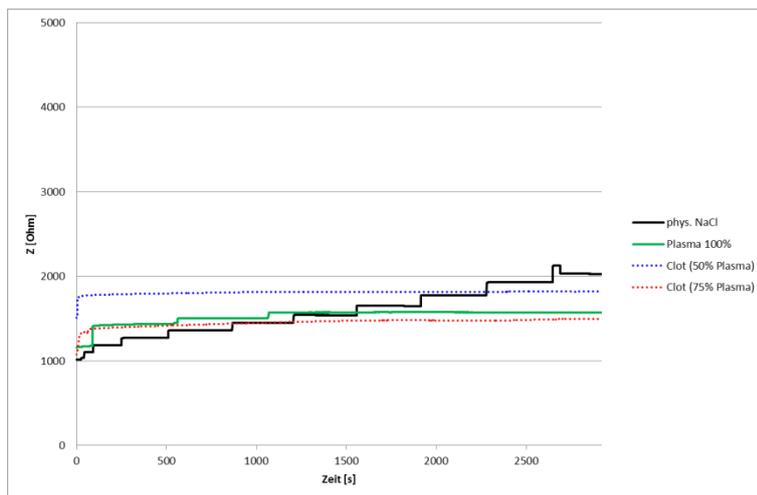


Abb. 55: Impedanzmessungen mit eingerollten Gold-Elektrodenplatten in unterschiedlichen Messlösungen: 0,9% NaCl-Lösung, 100% Plasma, Plasmaclot-Gemisch mit 50% bzw. 75% Plasma und CaCl_2 .

Die Ergebnisse demonstrierten, dass die Elektrodengröße einen entscheidenden Einfluss auf die Impedanzmessungen hatte. Die kleineren EEG-Platin-Nadelelektroden zeigten größere Impedanzwerte als die größeren Gold-Elektrodenplatten.

4.6.2 Versuchsdurchführung

Problematisch erwies sich die Clot-Polymerisation im elektrischen Feld mittels Gleichstrom. In Abbildung 56 wird deutlich sichtbar, dass es innerhalb von 1 Minute bei beiden Elektrodentypen zu einer Dissoziation des Plasmas kam.

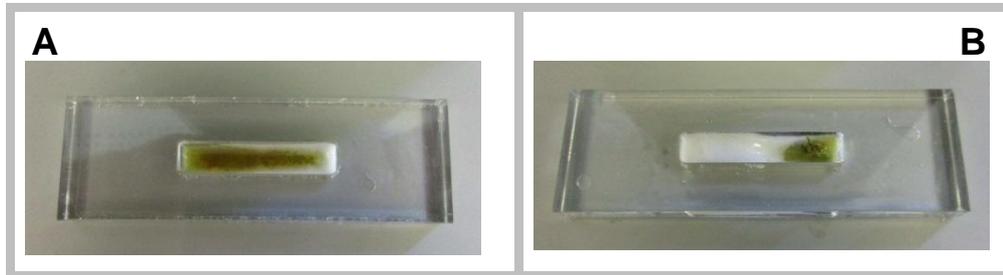


Abb. 56: Kammern wurden mit einem Plasmaclot-Gemisch (100% Plasma) befüllt. A: EEG-Platin-Elektroden, B: zusammengerollte Gold-Elektrodenplatten, 10mA

Aufgrund der Plasmadissoziation lässt sich daher konstatieren, dass die Verwendung von Metallelektroden für die Fibrinfaserausrichtung im elektrischen Feld ungeeignet ist, da dadurch eine Clot-Polymerisation unmöglich gemacht wird.

Ausgehend von diesem Resultat wurde eine neue Methode zur Fibrinfaserausrichtung im elektrischen Feld erarbeitet und umgesetzt (siehe folgenden Abschnitt).

4.7 Clot-Polymerisation im elektrischen Feld einer Korona-Entladung

Mit dem neuen Ausrichtungsverfahren konnte gezeigt werden, dass sich die Fibrinfasern eines Plasmaclots im elektrischen Feld einer Korona-Entladung in eine Vorzugsrichtung bringen lassen und dabei gleichzeitig Zellen integriert werden können.

Die entstandenen Fibrinfaserausrichtungen wurden mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert (Abb. 57A, C, E). Zur genaueren Charakterisierung des Einflusses des Ausrichtungsverfahrens auf die Fasereigenschaften wurden die resultierenden Aufnahmen anschließend mit der Fast Fourier Transformation (FFT) ausgewertet und ergänzend die Halbwertsbreite (Full Width at Half Maximum, FWHM) und die Peak Area X_{\min} to X_{\max} sowie der Alignment Index berechnet. (Abb. 57B, D, F und Tab. 14).

Kontrollclots mit einem Plasmaanteil von 50% formten ein zufällig organisiertes, homogenes Fibrin-Netzwerk (Abb. 57A), während Clots nach Polymerisation im elektrischen Feld einer Korona-Entladung längs orientierte Fibrinfasern zeigten (Abb. 57C und E). Die Ausrichtung erfolgte hierbei längs zum elektrischen Feld. Wie in den Abbildungen 57C und 57E erkennbar, lagen die ausgerichteten Fasern gleichmäßig parallel nebeneinander in der Fibrinmatrix.

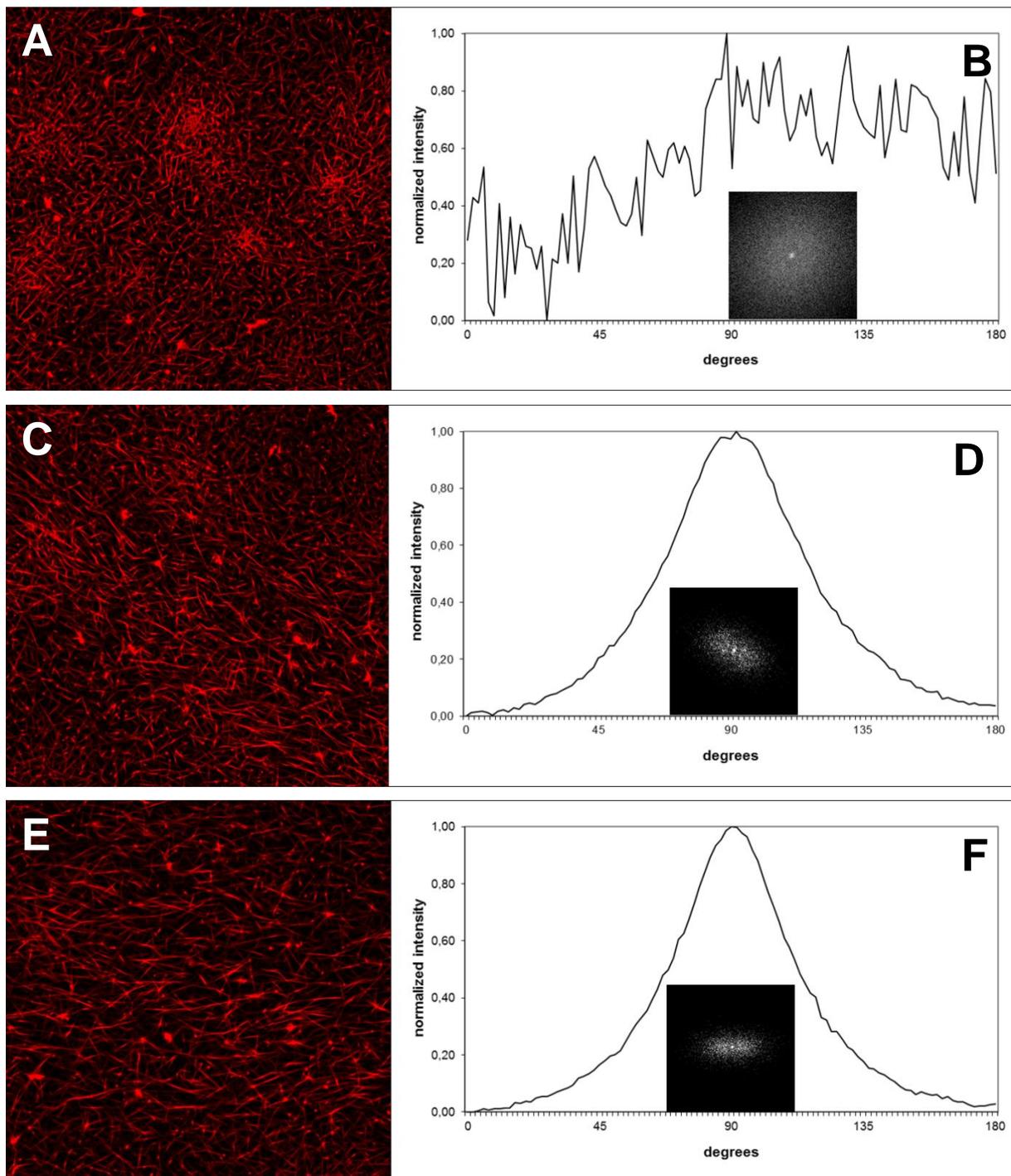


Abb. 57: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen (A, C und E) sowie zugehörige FFT-Bilder und FFT-Plots eines polymerisierten Kontroll-Clots (A und B) sowie eines Plasmaclots nach Polymerisierung im elektrischen Feld einer Korona-Entladung bei 6,5 KV (C und D sowie E und F). Plasmaclots wurden im Leitschienen-Modell (Einkammersystem) mit einem Plasmaanteil von 50% hergestellt.

Bei einer Spannung von 6,5 KV betrug die minimale Halbwertsbreite für Plasmaclots mit 50% Plasma 52 ± 6 , die Peak Area 2239501 ± 188310 und der Alignment Index $2,4 \pm 0,1$ (Tab. 14).

Tab. 14: Auswertung der FFT-Analyse von Plasmaclots, hergestellt mit 50% Plasma, nach Polymerisation im elektrischen Feld einer Korona-Entladung bei 6,5 KV im Leitschienen-Modell. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. der FWHM, der Area Xmin to Xmax und des Alignment Indexes (n = 5 unabhängige Versuche).

	Hochspannung 6,5 KV
FWHM	52 \pm 6
Area Xmin to Xmax	2239501 \pm 188310
Alignment Index	2,4 \pm 0,1

Zugesetzte MSC) blieben nach der Ausrichtungsmethode im elektrischen Feld einer Korona-Entladung viabel und das angestrebte gerichtete Zellwachstum wurde durch die Längsorientierung der Fibrinfasern gefördert (Abb. 58B - D).

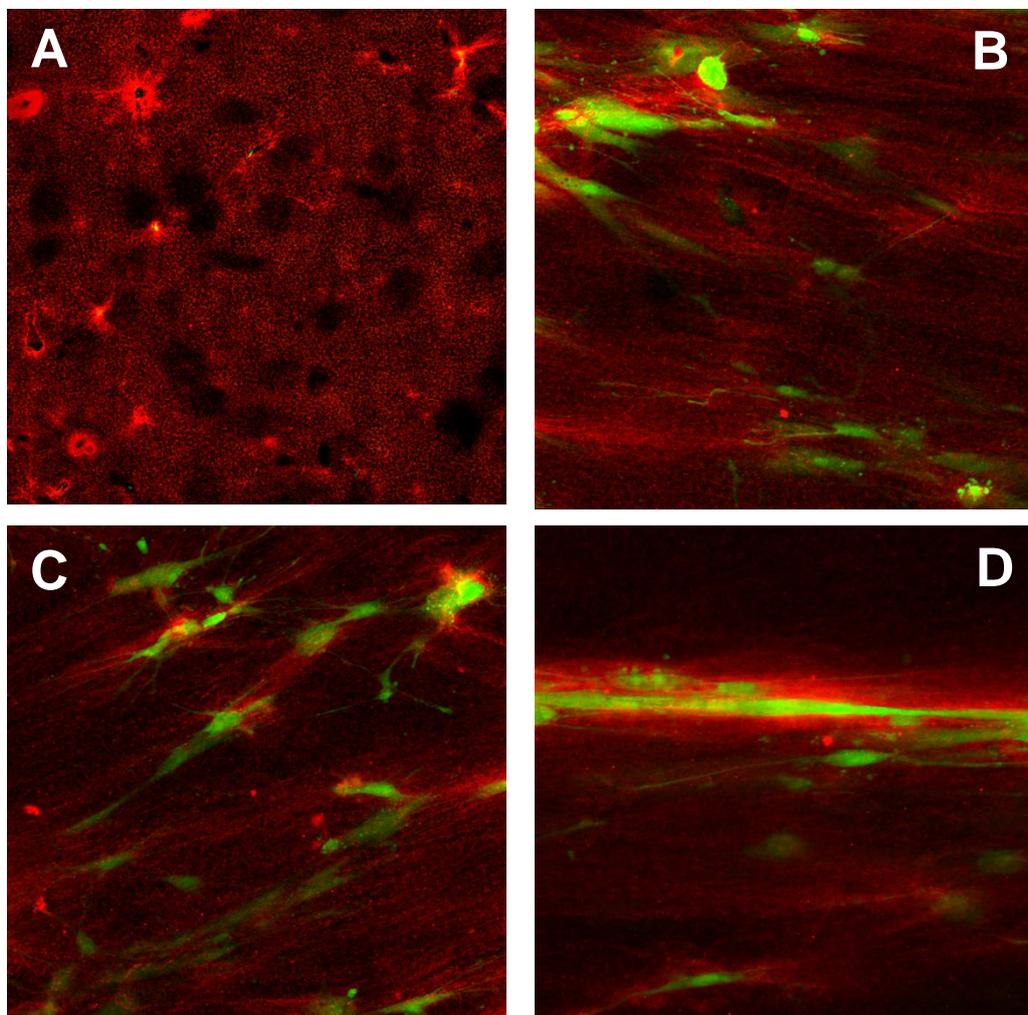


Abb. 58: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) eingebettet in Plasmaclots nach Polymerisation im Leitschienen-Modell (Einkammersystem) unter folgenden verschiedenen Versuchsbedingungen: A: statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation), B - D: im elektrischen Feld (Hochspannung: 6,5 KV). Nach einer Inkubationszeit von 48h bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen mit Calcein-AM (grün) gefärbt.

Zusammengefasst konnte mit den Ergebnissen gezeigt werden, dass nach Clot-Polymerisation im elektrischen Feld einer Korona-Entladung eine optimale Ausrichtung der Fibrinfasern im Leitschienenmodell erreicht wurde und dabei gleichzeitig Zellen integriert werden konnten.

4.8 Einfluss der unterschiedlichen Fibrinmatrices auf mesenchymale bzw. neuronale Stammzellen

Zugesetzte humane mesenchymale Stammzellen (MSC) sowie humane neuronale Stammzellen (H9) blieben nach allen Ausrichtungsmethoden vital. Durch die Längsorientierung der Fibrinfasern wurde das gerichtete Wachstum dieser Zellen gefördert (Abb. 59 und 60).

MSC wiesen im Kontrollclot ein gleichmäßiges, ungerichtetes Wachstum auf und zeigten eine polygonale, flächige Morphologie (Abb. 59A – B). Dagegen verdeutlichen die Abbildungen 59C - E, dass in longitudinal ausgerichteten Plasmaclots im Vergleich zum Kontrollclot die ursprüngliche Organisationsstruktur der MSC nicht mehr vorhanden war. Die Zellen waren in Reihen zwischen den längsgerichteten Fibrinfasern angeordnet und in Richtung der Flow-Bewegung bzw. des elektrischen Feldes ausgerichtet. Besonders bei stark ausgerichteten Fasern kam es zusätzlich zu einer deutlichen Veränderung der Morphologie hin zu einer elongierten Zellform (Abb. 59E und F). Nach Clot-Polymerisation im elektrischen Feld (25 KV) zeigten nahezu alle MSC diese Morphologie mit hochgradig paralleler Ausrichtung der Zellen untereinander (Abb. 59E und F).

Eingebettete H9-Zellen zeigten ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten (Abb. 60). Während im Kontrollclot die H9-Zellen homogen und ungerichtet verteilt waren (Abb. 60A und B), wurde das longitudinale Richtungswachstum durch die Längsorientierung der Fibrinfasern unterstützt (Abb. 60C – E). Desweiteren zeigten die H9-Zellen morphologische Unterschiede. In Kontrollclots war die Zellmorphologie hauptsächlich rund (Abb. 60A) und die Zellen bildeten in einigen Bereichen Neurosphären (Abb. 60B). Im Gegensatz dazu streckten sich die H9-Zellen an den längsgerichteten Fibrinfasern aus und bildeten eine längliche Zellmorphologie (Abb. 60C – E).

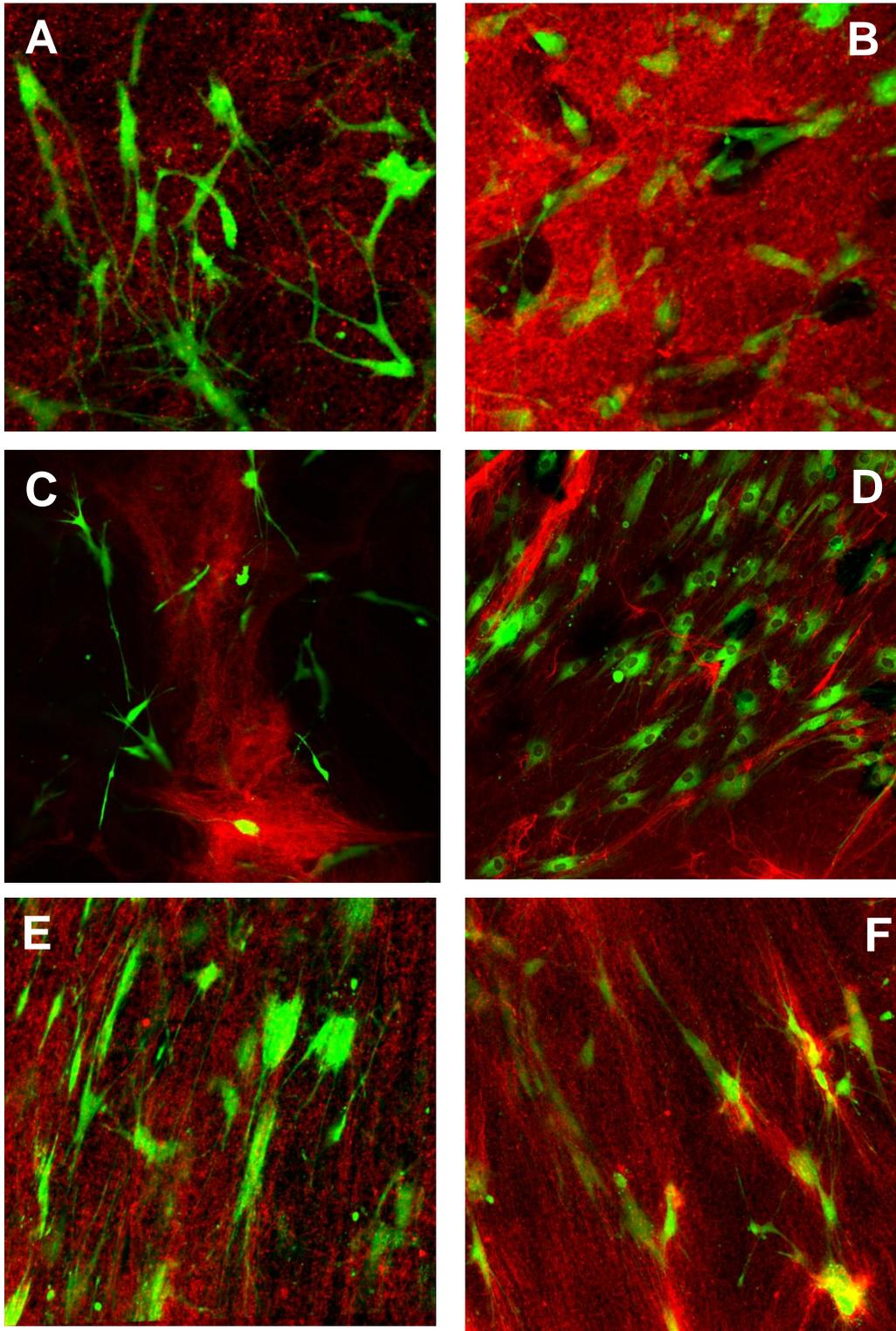


Abb. 59: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) eingebettet in Plasmaclots nach Polymerisation unter folgenden verschiedenen Versuchsbedingungen:
 A-B: statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation)
 C: unter Flow-Bedingungen auf einem Wippschüttler (50 rpm)
 D: unter Flow-Bedingungen auf einem Horizontalschüttler (100 rpm)
 E: im elektrischen Feld (25 KV), F: im elektrischen Feld einer Korona-Entladung (6,5 KV). Nach einer Inkubationszeit von 48h bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen mit Calcein-AM gefärbt (grün).

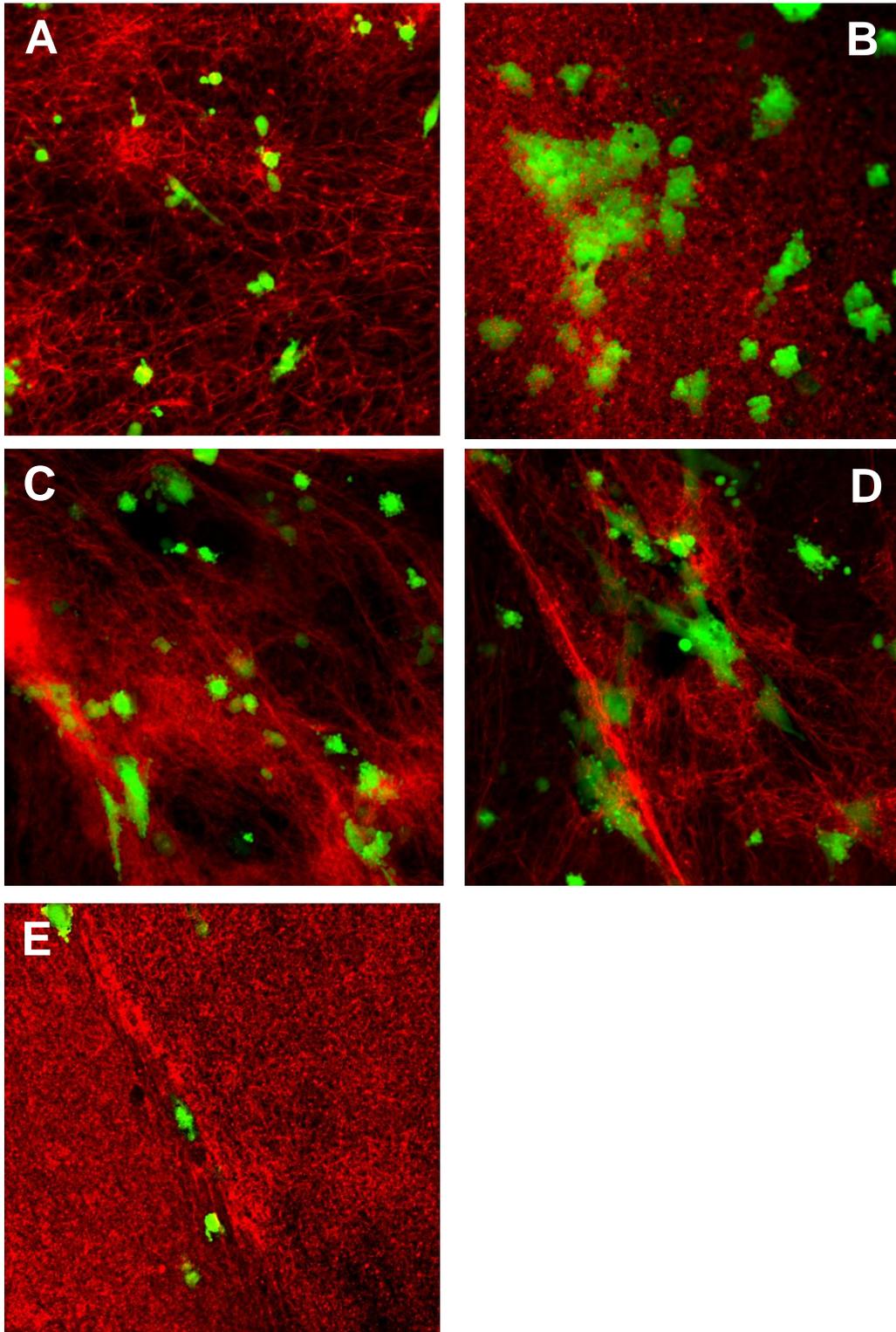


Abb. 60: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen von humanen neuronalen Stammzellen (H9) eingebettet in Plasmaclots nach Polymerisation unter folgenden verschiedenen Versuchsbedingungen:
A-B: statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation)
C: unter Flow-Bedingungen auf einem Wippschüttler (40 rpm)
D: unter Flow-Bedingungen auf einem Horizontalschüttler (70 rpm)
E: im elektrischen Feld (25 KV). Nach einer Inkubationszeit von 48h bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen mit Calcein-AM gefärbt (grün).

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Orientierung der Fibrinfasern sowohl die Zellmorphologie als auch die Zellorganisation stark beeinflussten.

Desweiteren zeigten diese Zellanalysen, dass sich das morphologische Erscheinungsbild der Zellen in der 3-dimensionalen Plasmaclot-Matrix grundlegend von adhärennten Zellen auf einer Oberfläche unterschied. Adhärennte H9-Zellen und besonders MSC hatten einen großen Durchmesser und weitreichende Zellfortsätze (Abb. 61A und D). Dagegen Zellen, die komplett von einer ungerichteten Clot-Matrix umschlossen wurden, erschienen kleiner, rundlich und bildeten deutlich kürzere Fortsätze aus (Abb. 61B und E). Die gezielte Ausrichtung der Fibrinfasern verursachte bei beiden Zelltypen eine morphologische Anpassungsreaktion, die in einer langen spindelförmigen Verformung der Zellen resultierte (Abb. 61C und F).

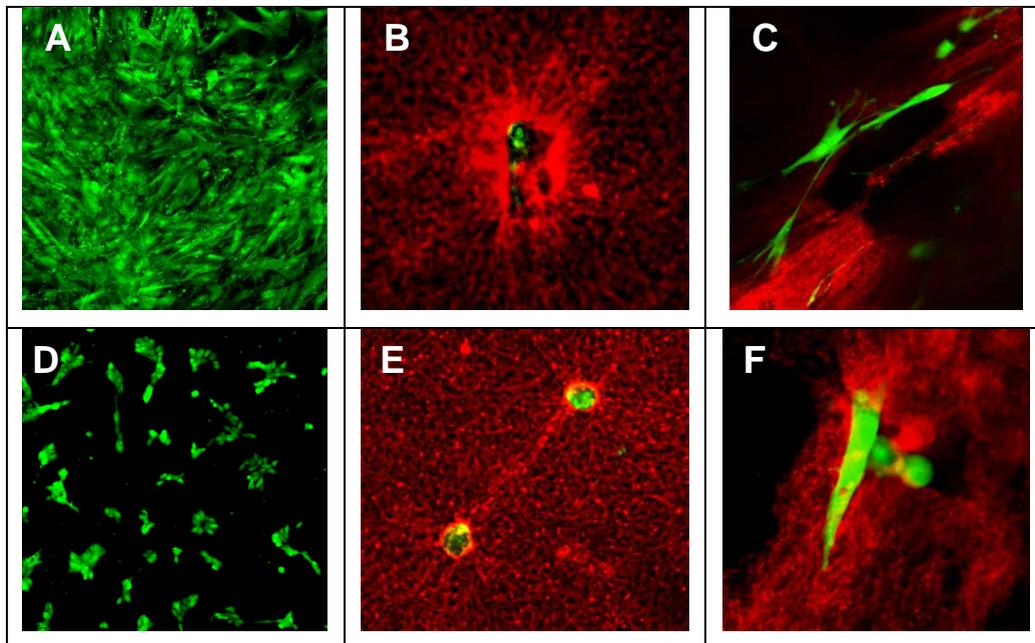


Abb. 61: Zellmorphologie in einer 3-dimensionalen Plasmaclot-Matrix im Vergleich zu adhärennten Zellen auf einer Oberfläche. A: adhärennte MSC. B: Stammzelle komplett von einer ungerichteten Plasmaclot-Matrix umschlossen. C: morphologische Anpassung von MSC an einem längs orientierten Fibrinfaserstrang. D: adhärennte H9-Zellen auf einer Oberfläche. E: H9-Zellen umschlossen von einer ungerichteten Plasmaclot-Matrix. F: morphologische Anpassung einer H9-Zelle an einem längs orientierten Fibrinfaserstrang.

Diese Ergebnisse implizieren, dass Plasmaclots mit ungerichteten Fibrinfasern infolge ihres sehr dichten Fibrinnetzwerks als physische Barriere fungieren und dadurch die Zellmigration behindern. Dagegen zeigen Clots mit längs orientierten Fasern einen kontroversen Effekt. Sowohl MSC als auch H9-Zellen passen sich morphologisch an den längs orientierten Fibrinfasern an und wandern ohne Behinderung durch das lockere Fibrinnetzwerk. Daher

scheint ein Clot mit ausgerichteten Fibrinfasern die ideale Wahl zur Befüllung von Nervenleitschienen zu sein.

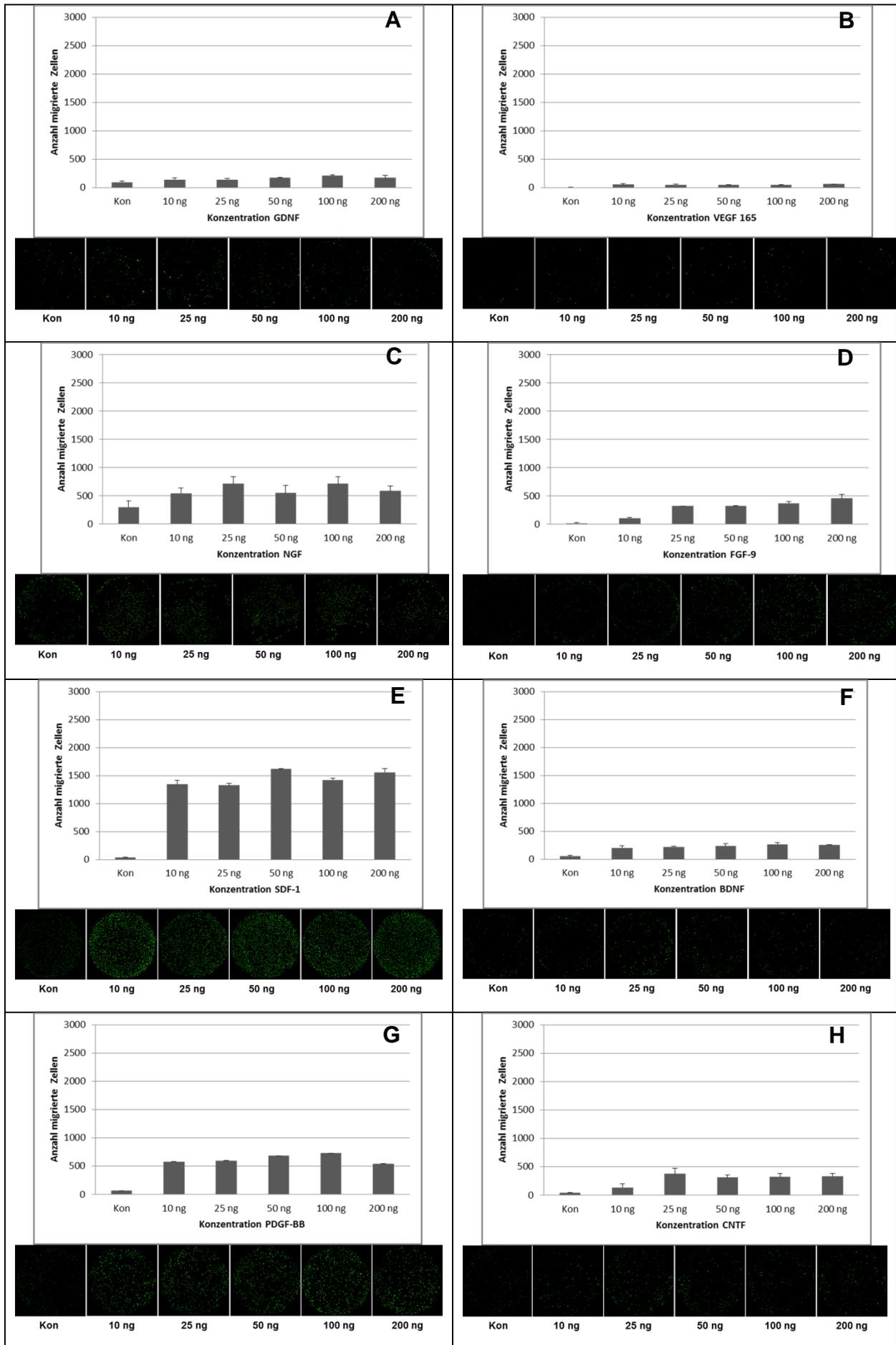
4.9 Chemotaxis Assay mit HTS FluoroBlok Zellkultureinsätzen

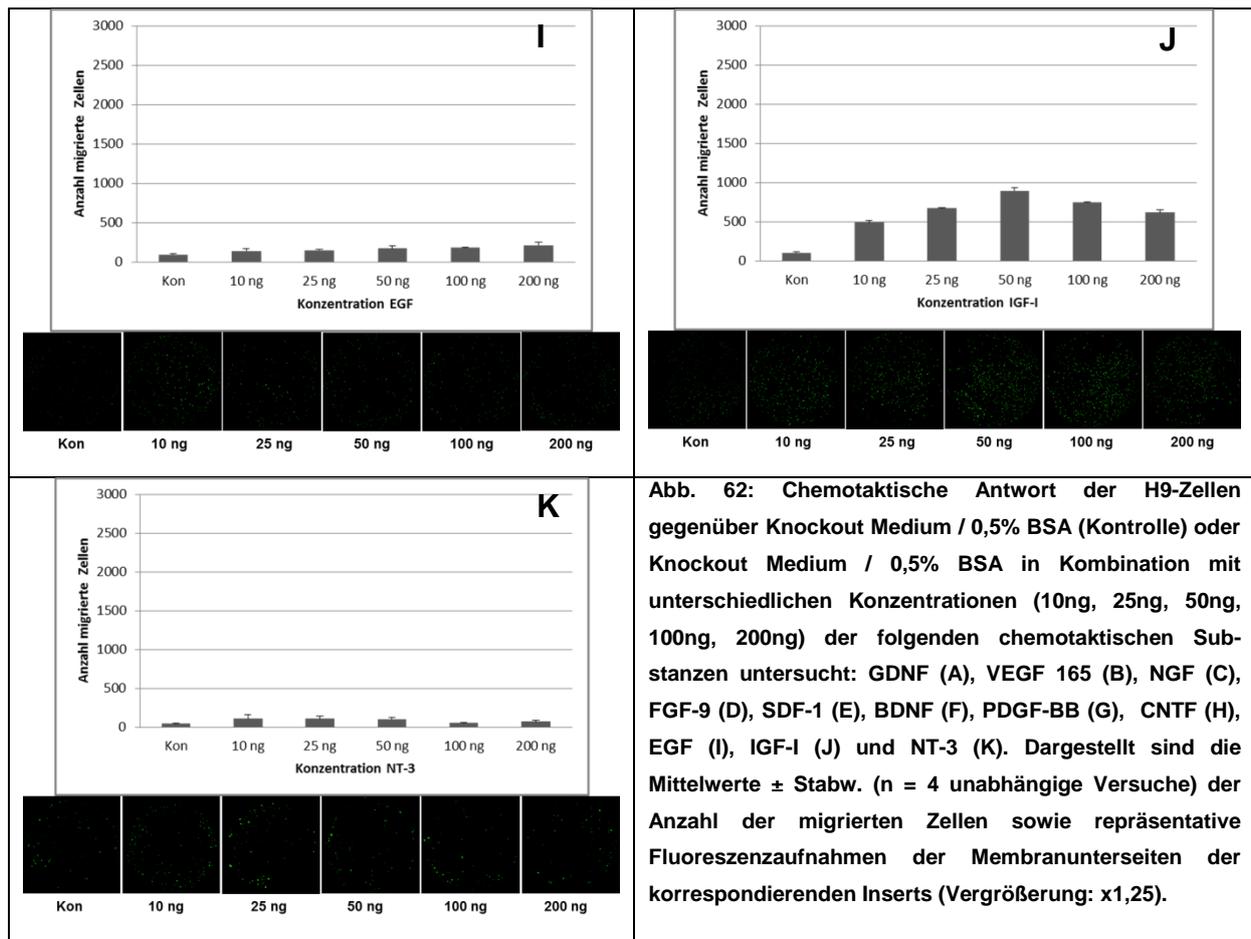
Im standardisierten Chemotaxis Assay mit HTS FluoroBlok Zellkultureinsätzen wurde getestet, welches der Chemokine zu einer aktiven Transmigration der H9-Zellen bzw. der MSCs führte. Hierbei wurden Faktoren getestet, denen in der Literatur ein migrationsauslösendes Potential zugeschrieben war.

In Vorversuchen wurden sowohl für MSC als auch für H9-Zellen zunächst die optimale Zelldichte sowie die optimale Inkubationszeit ermittelt. Zur Optimierung der Zelldichte wurden H9 Zellen bzw. MSC in unterschiedlichen Zellkonzentrationen in die Inserts gegeben und 24h im Brutschrank inkubiert. Es ergab sich, dass eine Ausgangszellzahl von 3×10^5 Zellen / 300µl Medium für H9-Zellen und 2×10^4 Zellen / 300µl Medium für MSC einen optimalen Zellrasen im Insert bildete. Eine höhere Zellzahl stellte sich als problematisch heraus, da nach der Inkubationszeit eine Ablösung des Zellrasens bei beiden Zelltypen beobachtet wurde. Zur anschließenden Optimierung der Inkubationszeit wurden die Zellen mit der optimierten Zellzahl für 24h, 48h und 72h in Anwesenheit von SDF-1 sowie PDGF-BB im Brutschrank inkubiert. Hierbei erwies sich eine Inkubationszeit von 48h sowohl für H9-Zellen als auch für MSC als optimal, da die Anzahl der migrierten Zellen im Vergleich zur Inkubationszeit von 24h gesteigert wurde. Die höhere Inkubationszeit von 72h zeigte dagegen keinen weiteren positiven Effekt auf die Anzahl der migrierten Zellen.

4.9.1 FluoroBlok-Chemotaxis Assay mit H9-Zellen

In die Membraninserts des Zweikammersystems wurden jeweils 3×10^5 Zellen / 300µl Knockout Medium / 0,5% BSA gefüllt. Eine Versuchsserie bestand aus einer Faktormessung und einer Referenzmessung. Während bei der Faktormessung die unteren Kompartimente mit unterschiedlichen chemotaktischen Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen (10ng, 25ng, 50ng, 100ng, 200ng) befüllt wurden, wurden in die Kompartimente der Referenzmessung nur Knockout Medium / 0,5% BSA gegeben. Diese Referenzmessung diente als Negativkontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 48h und Anfärben der Zellen mit Calcein-AM auf der Unterseite der Membran konnte über das Auszählen der migrierten Zellen die Chemotaxis quantifiziert werden. Die Abbildungen 62A - F dokumentieren die Ergebnisse dieser FluoroBlok-Chemotaxis Assays anhand von Graphiken, die die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten zusammenfassen. Einzelne repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Membranen mit migrierten Zellen (Insert-Unterseite) werden ebenfalls dort dargestellt.





Wie die gemessenen Zellzahlen in Abbildung 62 zeigen, hatte bei den Negativkontrollen trotz Fehlen eines Gradienten eine minimale ungerichtete Transmigration stattgefunden. So migrierten eine geringe Anzahl der Zellen von 0,002% bis maximal 0,1% der Ausgangszellzahl bei der Negativkontrolle auf die Membranunterseite.

Beim Vergleich der migrierten Zellen konnten mittels 1-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche signifikante Unterschiede zwischen folgenden Faktoren und den dazugehörigen Negativkontrollen aufgezeigt werden: VEGF 165, NGF, FGF-9 (Ausnahme: 10ng vs. Kon), SDF-1, BDNF, PDGF-BB, IGF-I (Tab. 15). Dagegen waren alle Faktorkonzentrationen von GDNF sowie fast alle von CNTF und EGF bei Testung gegen die Kontrolle statistisch nicht signifikant.

Tab. 15: Analyse der Signifikanz ($p < 0,05$) mittels 1-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche.

	Kon	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng	200ng
GDNF (Abb.xA)						
Kon		N / S	N / S	N / S	N / S	N / S
10 ng	N / S		N / S	N / S	N / S	N / S
25 ng	N / S	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	N / S	N / S	N / S		N / S	N / S
100 ng	N / S	N / S	N / S	N / S		N / S
200 ng	N / S	N / S	N / S	N / S	N / S	
VEGF 165 (Abb.xB)						
Kon		$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,01$
10 ng	$p < 0,01$		N / S	N / S	N / S	N / S
25 ng	$p < 0,05$	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	$p < 0,05$	N / S	N / S		N / S	N / S
100 ng	$p < 0,05$	N / S	N / S	N / S		N / S
200 ng	$p < 0,01$	N / S	N / S	N / S	N / S	
NGF (Abb.xC)						
Kon		$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,05$
10 ng	$p < 0,05$		N / S	N / S	N / S	N / S
25 ng	$p < 0,01$	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	$p < 0,05$	N / S	N / S		N / S	N / S
100 ng	$p < 0,01$	N / S	N / S	N / S		N / S
200 ng	$p < 0,05$	N / S	N / S	N / S	N / S	
FGF-9 (Abb.xD)						
Kon		N / S	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
10 ng	N / S		$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,001$
25 ng	$p < 0,001$	$p < 0,01$		N / S	N / S	N / S
50 ng	$p < 0,001$	$p < 0,01$	N / S		N / S	N / S
100 ng	$p < 0,001$	$p < 0,01$	N / S	N / S		N / S
200 ng	$p < 0,001$	$p < 0,001$	N / S	N / S	N / S	
SDF-1 (Abb.xE)						
Kon		$p < 0,0001$				
10 ng	$p < 0,0001$		N / S	$p < 0,05$	N / S	$p < 0,05$
25 ng	$p < 0,0001$	N / S		$p < 0,01$	N / S	$p < 0,05$
50 ng	$p < 0,0001$	$p < 0,05$	$p < 0,01$		N / S	N / S
100 ng	$p < 0,0001$	N / S	N / S	N / S		N / S
200 ng	$p < 0,0001$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	N / S	N / S	
BDNF (Abb.xF)						
Kon		$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
10 ng	$p < 0,05$		N / S	N / S	N / S	N / S
25 ng	$p < 0,05$	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	$p < 0,05$	N / S	N / S		N / S	N / S
100 ng	$p < 0,01$	N / S	N / S	N / S		N / S
200 ng	$p < 0,01$	N / S	N / S	N / S	N / S	
PDGF-BB (Abb.xG)						
Kon		$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,01$
10 ng	$p < 0,01$		N / S	N / S	N / S	N / S
25 ng	$p < 0,01$	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	$p < 0,001$	N / S	N / S		N / S	N / S
100 ng	$p < 0,001$	N / S	N / S	N / S		N / S
200 ng	$p < 0,01$	N / S	N / S	N / S	N / S	
CNTF (Abb.xH)						
Kon		N / S	$p < 0,05$	N / S	N / S	$p < 0,05$
10 ng	N / S		N / S	N / S	N / S	N / S

25 ng	p<0,05	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	N / S	N / S	N / S		N / S	N / S
100 ng	N / S	N / S	N / S	N / S		N / S
200 ng	p<0,05	N / S	N / S	N / S	N / S	
EGF (Abb.xI)						
Kon		N / S	N / S	N / S	N / S	p<0,05
10 ng	N / S		N / S	N / S	N / S	N / S
25 ng	N / S	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	N / S	N / S	N / S		N / S	N / S
100 ng	N / S	N / S	N / S	N / S		N / S
200 ng	p<0,05	N / S	N / S	N / S	N / S	
IGF-I (Abb.xJ)						
Kon		p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
10 ng	p<0,01		N / S	p<0,01	p<0,05	N / S
25 ng	p<0,001	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	p<0,001	p<0,01	N / S		N / S	p<0,05
100 ng	p<0,001	p<0,05	N / S	N / S		N / S
200 ng	p<0,001	N / S	N / S	p<0,05	N / S	
NT-3 (Abb.xK)						
Kon		N / S	N / S	N / S	N / S	N / S
10 ng	N / S		N / S	N / S	N / S	N / S
25 ng	N / S	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	N / S	N / S	N / S		N / S	N / S
100 ng	N / S	N / S	N / S	N / S		N / S
200 ng	N / S	N / S	N / S	N / S	N / S	

Zusätzlich wurde die Zellmigration über den Chemotaxis Index (CI) berechnet (Tab. 16). Um die Korrelation zwischen Faktorkonzentration und dem Chemotaxis Index (CI) zu verifizieren, wurde zusätzlich die Korrelation nach Pearson durchgeführt (Tab. 16).

Tab. 16: Chemotaxis Index (CI) der unterschiedlichen chemotaktischen Substanzen in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Korrelation zwischen Faktorkonzentration und dem CI wurde mit der Korrelation nach Pearson analysiert (blau markierte Spalten).

	Konzentrationen					Korrelation nach Pearson	
	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng	200 ng	Korrelationskoeffizient (r)	Signifikanz
GDNF	0,9	0,9	1,3	1,7	1,3	0,5526	N / S
VEGF 165	8,8	7,7	7,8	7,2	10,2	0,6005	N / S
NGF-beta	2,5	3,6	2,5	3,6	2,8	0,0290	N / S
FGF-9	4,8	16,3	16,4	19,1	23,8	0,8160	N / S
SDF-1	29,6	29,2	35,8	31,4	34,5	0,5508	N / S
BDNF	2,4	2,8	3,0	3,5	3,4	0,8063	N / S
PDGF-BB	7,7	7,9	9,2	9,9	7,1	-0,2094	N / S
CNTF	2,0	7,4	6,0	6,2	6,5	0,4064	N / S
EGF	0,5	0,6	0,8	0,9	1,2	0,9749	p<0,01
IGF-I	3,5	5,2	7,3	5,9	4,7	0,0272	N / S
NT-3	1,2	1,3	1,2	0,2	0,5	-0,7489	N / S

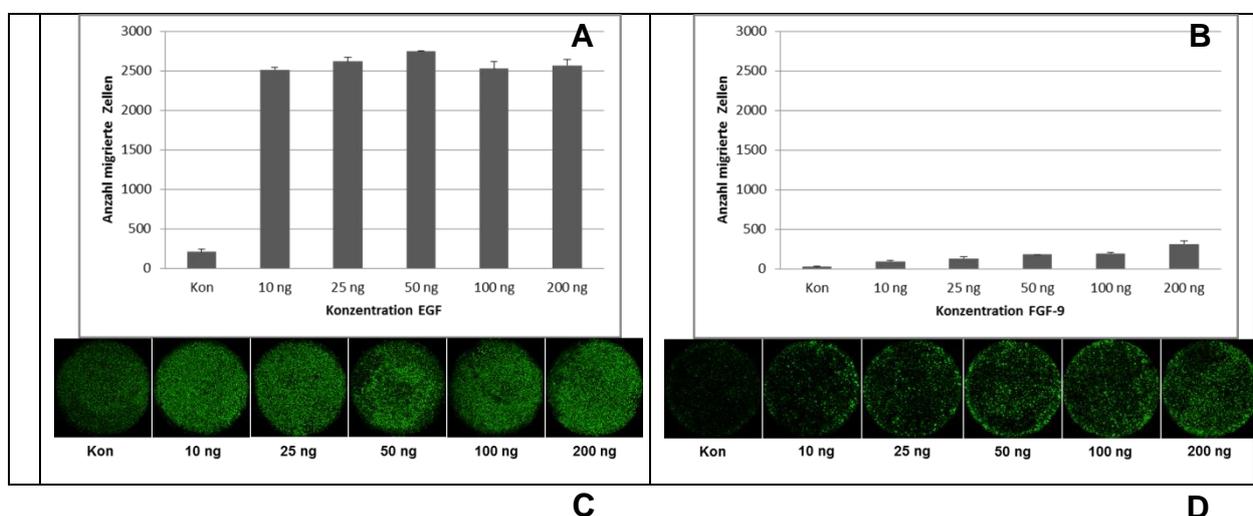
Die CI-Werte der Wachstumsfaktoren VEGF 165, FGF-9, IGF-I, PDGF-BB sowie des Zytokins SDF-1 und des neuralen Wachstumsfaktors CNTF demonstrierten die höchsten Werte. Um die Korrelation zwischen Faktorkonzentration und dem Chemotaxis Index (CI) zu verifizieren, wurde zusätzlich die Korrelation nach Pearson durchgeführt. Eine signifikante positive Korrelation zeigte sich nur bei EGF ($r = 0,9749$; $p < 0,01$). Hier wurden bei steigenden Konzentrationen korrespondierend höhere CI-Werte beobachtet. Die anderen chemotaktischen Substanzen wiesen nur eine geringere Korrelation auf, die nicht signifikant war.

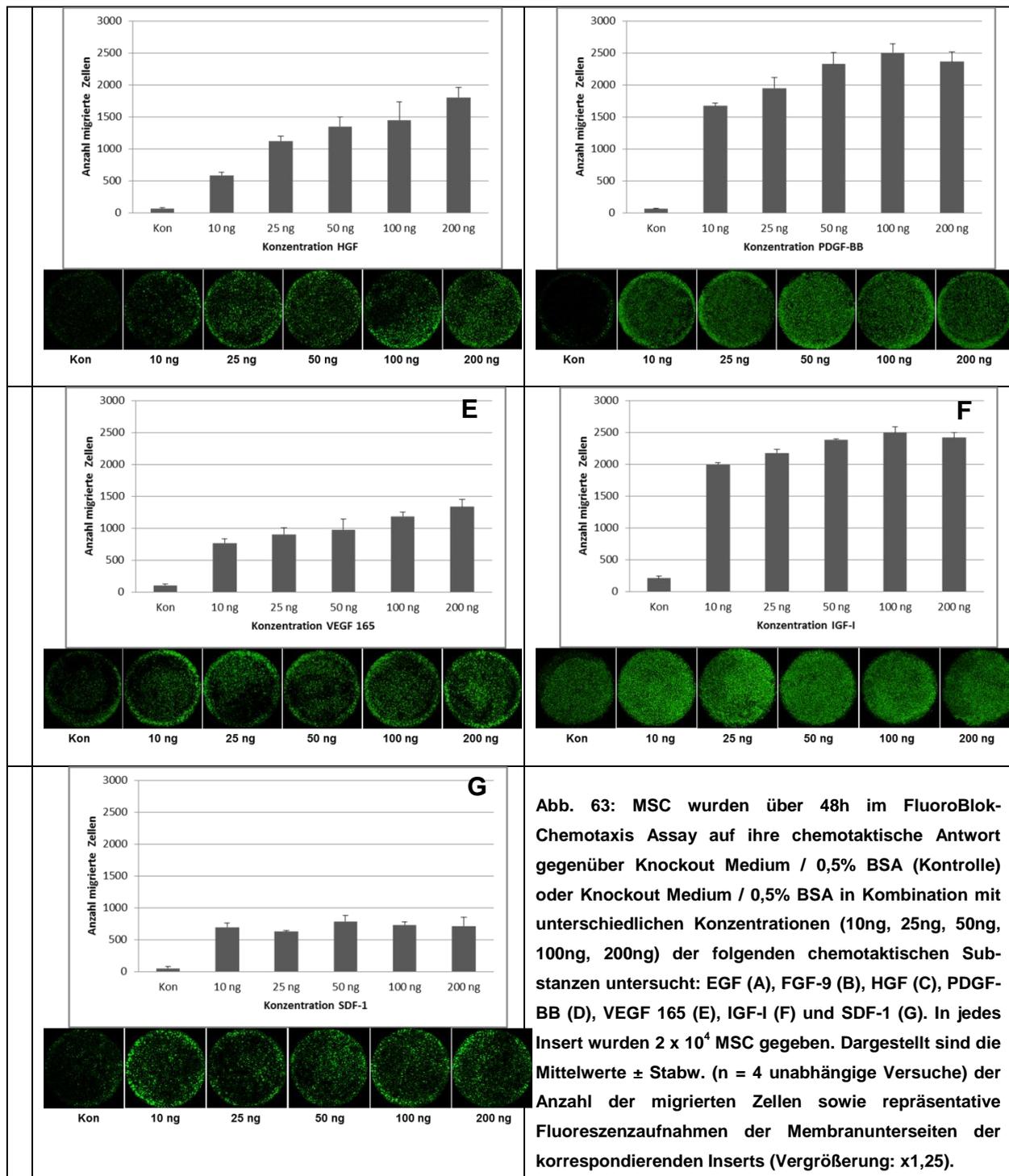
4.9.2 FluoroBlok-Chemotaxis Assay mit MSC

Die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren (EGF, FGF-9, IGF-I, HGF, PDGF-BB, VEGF-165) sowie des Zytokins SDF-1 wurde auf das chemotaktische Potential humaner mesenchymaler Stammzellen im HTS FluoroBlok 24-Well Insert System getestet. Die Auswertung erfolgte nach einer 48-stündigen Migrationsperiode durch Calcein-AM-Färbung und Auszählung der migrierten Zellen. Die Abbildungen 63A - F dokumentieren die Ergebnisse dieser FluoroBlok-Chemotaxis Assays anhand von Graphiken und repräsentativen Fluoreszenzaufnahmen der Membranen mit migrierten Zellen (Unterseite) nach 48h Migration und anschließender Calcein-AM-Färbung.

Wie bei den H9-Zellen fand bei den Negativkontrollen auch ohne Gradient eine minimale ungerichtete Transmigration statt. So migrierten eine geringe Anzahl der Zellen von 0,1% bis maximal 1,1% der Ausgangszellzahl bei der Negativkontrolle auf die Membranunterseite.

Bei Betrachtung der absolut migrierten Zellen zeigte sich, wie in Tabelle 17 ersichtlich, beim 1-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche eine Signifikanz für alle Faktorkonzentrationen bei Testung gegen die Kontrolle, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angesetzt wurde. Alle zugegebenen chemotaktischen Faktoren erhöhten somit die basale Migration (Kon), wobei sich PDGF-BB, SDF-1 und EGF als die effektivsten Stimuli auszeichneten.





Tab. 17: Analyse der Signifikanz ($p < 0,05$) mittels 1-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche.

	Kon	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng	200ng
EGF (Abb.xA)						
Kon		$p < 0,0001$				
10 ng	$p < 0,0001$		N / S	$p < 0,05$	N / S	N / S
25 ng	$p < 0,0001$	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	$p < 0,0001$	$p < 0,05$	N / S		$p < 0,05$	$p < 0,05$

100 ng	p<0,0001	N / S	N / S	p<0,05		N / S
200 ng	p<0,0001	N / S	N / S	p<0,05	N / S	
FGF-9 (Abb.xB)						
Kon		N / S	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,001
10 ng	N / S		N / S	N / S	p<0,05	p<0,001
25 ng	p<0,05	N / S		N / S	N / S	p<0,01
50 ng	p<0,01	N / S	N / S		N / S	p<0,05
100 ng	p<0,01	p<0,05	N / S	N / S		p<0,05
200 ng	p<0,001	p<0,001	p<0,01	p<0,05	p<0,05	
HGF (Abb.xC)						
Kon		N / S	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,001
10 ng	N / S		N / S	p<0,05	p<0,05	p<0,01
25 ng	p<0,01	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	p<0,01	p<0,05	N / S		N / S	N / S
100 ng	p<0,01	p<0,05	N / S	N / S		N / S
200 ng	p<0,001	p<0,01	N / S	N / S	N / S	
PDGF-BB (Abb.xD)						
Kon		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
10 ng	p<0,001		N / S	p<0,05	p<0,01	p<0,05
25 ng	p<0,001	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	p<0,001	p<0,05	N / S		N / S	N / S
100 ng	p<0,001	p<0,01	N / S	N / S		N / S
200 ng	p<0,001	p<0,05	N / S	N / S	N / S	
VEGF 165 (Abb.xE)						
Kon		p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,001
10 ng	p<0,01		N / S	N / S	N / S	p<0,05
25 ng	p<0,01	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	p<0,01	N / S	N / S		N / S	N / S
100 ng	p<0,001	N / S	N / S	N / S		N / S
200 ng	p<0,001	p<0,05	N / S	N / S	N / S	
IGF-I (Abb.xF)						
Kon		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
10 ng	p<0,001		N / S	p<0,01	p<0,01	p<0,01
25 ng	p<0,001	N / S		N / S	p<0,01	N / S
50 ng	p<0,001	p<0,01	N / S		N / S	N / S
100 ng	p<0,001	p<0,01	p<0,01	N / S		N / S
200 ng	p<0,001	p<0,01	N / S	N / S	N / S	
SDF-1 (Abb.xG)						
Kon		p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
10 ng	p<0,01		N / S	N / S	N / S	N / S
25 ng	p<0,01	N / S		N / S	N / S	N / S
50 ng	p<0,01	N / S	N / S		N / S	N / S
100 ng	p<0,01	N / S	N / S	N / S		N / S
200 ng	p<0,01	N / S	N / S	N / S	N / S	

Zusätzlich wurde die Zellmigration über den Chemotaxis Index (CI) berechnet (Tab. 18). Wie erwartet, zeigten die CI-Werte der Wachstumsfaktoren HGF, PDGF-BB und des Zytokins SDF-1 die höchsten Werte. Um die Korrelation zwischen Faktorkonzentration und dem Chemotaxis Index (CI) zu verifizieren, wurde hier ebenfalls die Korrelation nach Pearson durchgeführt. Eine signifikante positive Korrelation zeigte sich nur bei FGF-9 ($r = 0,9780$; $p < 0,005$) und VEGF 165 ($r = 0,9613$; $p < 0,01$). Bei diesen beiden Wachstumsfaktoren wurden bei steigenden Konzentrationen korrespondierend höhere CI-Werte beobachtet. Die anderen

chemotaktischen Substanzen wiesen nur eine geringere Korrelation auf, die nicht signifikant war (Tab. 18).

Tab. 18: Chemotaxis Index (CI) der unterschiedlichen chemotaktischen Substanzen in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Korrelation zwischen Faktorkonzentration und dem CI wurde mit der Korrelation nach Pearson analysiert (blau markierte Spalten).

	Konzentrationen					Korrelation nach Pearson	
	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng	200 ng	Korrelationskoeffizient (r)	Signifikanz
EGF	10,7	11,2	11,8	10,8	11,0	-0,1233	N / S
FGF-9	2,4	3,7	5,4	5,9	9,9	0,9780	p<0,005
HGF	7,1	14,4	17,5	18,9	23,7	0,8753	N / S
PDGF-BB	23,3	27,3	32,7	35,3	33,3	0,6879	N / S
VEGF 165	6,3	7,5	8,2	10,2	11,6	0,9613	p<0,01
IGF-I	8,3	9,2	10,1	10,7	10,3	0,6941	N / S
SDF-1	12,2	10,9	13,9	12,9	12,5	0,6683	N / S

4.9.3 FluoroBlok-Chemotaxis Assay mit Kokultur von MSC und H9-Zellen

Zur ergänzenden Analyse der H9-Chemotaxis wurden an Stelle von rekombinanten Chemokinen MSC direkt als Chemokindonoren in der unteren Kammer eingesetzt. MSC repräsentierten hierbei die Quelle des Chemokingradienten (Abb. 64). Um die Chemokinsekretion der MSC zu optimieren, wurden für die Versuche zwei unterschiedliche Zellkulturmedien verwendet. Bei der Wahl des richtigen Zellkulturmediums wurde neben der optimalen Chemokinexpression der MSC gleichzeitig die optimale Motilität der H9-Zellen berücksichtigt. In den Chemotaxisexperimenten ergab das RPMI / 10% FCS - Medium erwartungsgemäß im Vergleich zum Knockout / 0,5% BSA – Medium die höchste H9-Zellmigration (Abb. 64E) und erhöhte gleichzeitig die Zellproliferation der MSC in der unteren Kammer (Abb. 64 F).

Da die H9-Zellen bei Verwendung von RPMI / 10% FCS - Medium vorrangig dichte Zellhaufen auf der Membranunterseite bildeten, konnte die Anzahl der migrierten Zellen nicht berechnet werden (Abb. 64E). Lediglich für das Knockout / 0,5% BSA – Medium konnte die Chemotaxis der H9-Zellen in Richtung der MSC quantitativ ausgewertet werden (Abb. 65).

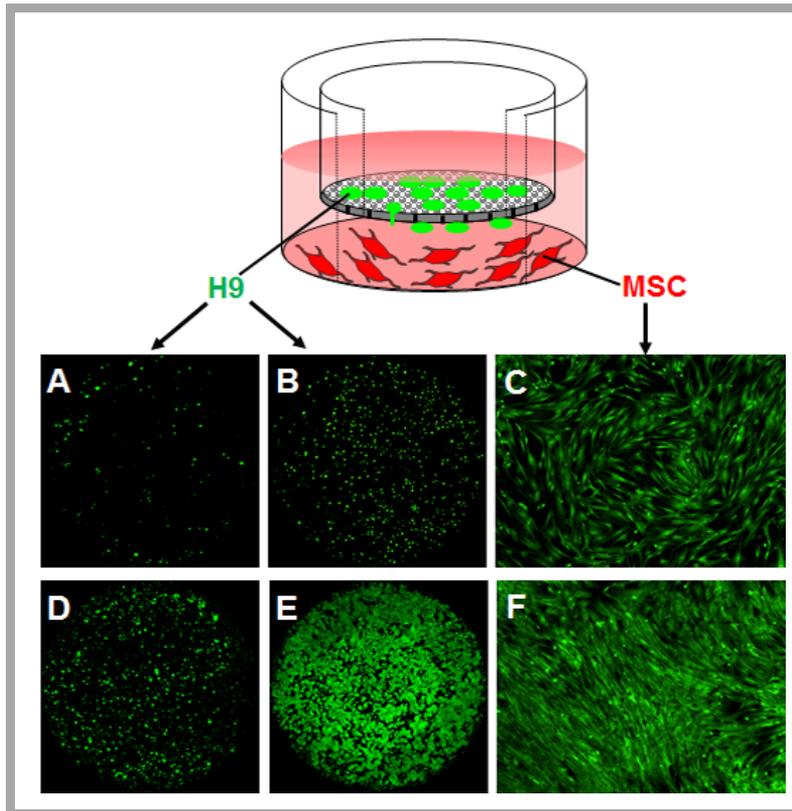


Abb. 64: FluoroBlok-Chemotaxis Assay nach Kokultur von H9-Zellen und MSC. A-B und D-E: Chemotaktische Migration von H9-Zellen auf die Membranunterseite in Richtung A: Knockout-Medium mit 0,5% BSA ohne MSC (Negativkontrolle) und B: MSC in Knockout-Medium mit 0,5% BSA sowie D: RPMI mit 10% FCS ohne MSC (Negativkontrolle) und E: MSC in RPMI / 10% FCS. C: MSC in Knockout-Medium / 0,5% BSA in der unteren Kammer. F: MSC in RPMI / 10% FCS in der unteren Kammer.

Für das Knockout / 0,5% BSA – Medium konnte mittels t-Test für unabhängige Stichproben eine signifikante chemotaktische Stimulation mit $p < 0,01$ gegenüber der Negativkontrolle ohne MSC gezeigt werden (Abb. 65).

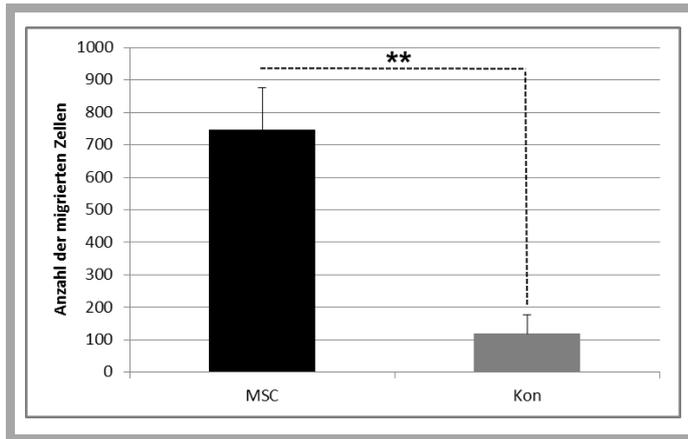


Abb. 65: Chemotaxis der H9-Zellen in Richtung MSC, kultiviert in Knockout-Medium / 0,5% BSA. Negativkontrolle: Knockout-Medium / 0,5% BSA ohne MSC. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. ($n = 3$ unabhängige Versuche) der Anzahl der migrierten Zellen. Die Auszählung erfolgte nach 48h. Signifikante Stimulation der Zellmigration im Vergleich zur Negativkontrolle im ungepaarten t-Test ($p < 0,01$).

Die Ergebnisse dokumentieren, dass die von den MSC sezernierten Faktoren eine signifikante chemotaktische Stimulation der H9-Zellen hervorriefen. Das Ausmaß der Stimulation war aber nicht allein von den MSC sondern auch vom eingesetzten Medium abhängig, wobei die stärkste motogene Zellantwort mit RPMI / 10% FCS – Medium ausgelöst wurde.

4.10 Kultivierung von H9-Zellen in Kokultur mit MSC im Plasmaclot

Die Beobachtungen an der dreidimensionalen Kokultur von H9-Zellen mit MSC im ausgerichteten Plasmaclot (Wippschüttler 60 rpm) zeigten mittels Laser-Scanning-Mikroskopie ein heterogenes Spektrum spezifischer Interaktionen zwischen beiden Zelltypen. Nach einer Inkubationszeit von 48h bildeten H9-Zellen einen adhäsiven Kontakt zur MSC-Oberfläche (Abb. 66 A - D) oder lagerten sich in dichten Clustern um die MSC herum (Abb. 66C). Sowohl MSC als auch H9-Zellen interagierten mit ihrer Umgebung, indem sie Kontakte zur Clotmatrix aufbauten (Abb. 66B).

Während im Kontrollclot (statisch) MSC sowie H9-Zellen homogen und ungerichtet verteilt waren (Abb. 66E und F), wurde das longitudinale Richtungswachstum durch die Längsorientierung der Fibrinfasern unterstützt (Abb. 66A – D). Desweiteren zeigten beide Zelltypen morphologische Unterschiede. In Kontrollclots war die Zellmorphologie hauptsächlich rundlich (Abb. 66E und F), während die gezielte Ausrichtung der Fibrinfasern auf dem Wippschüttler bei beiden Zelltypen eine morphologische Anpassungsreaktion verursachte, die in einer langen spindelförmigen Verformung der Zellen resultierte (Abb. 66A – D).

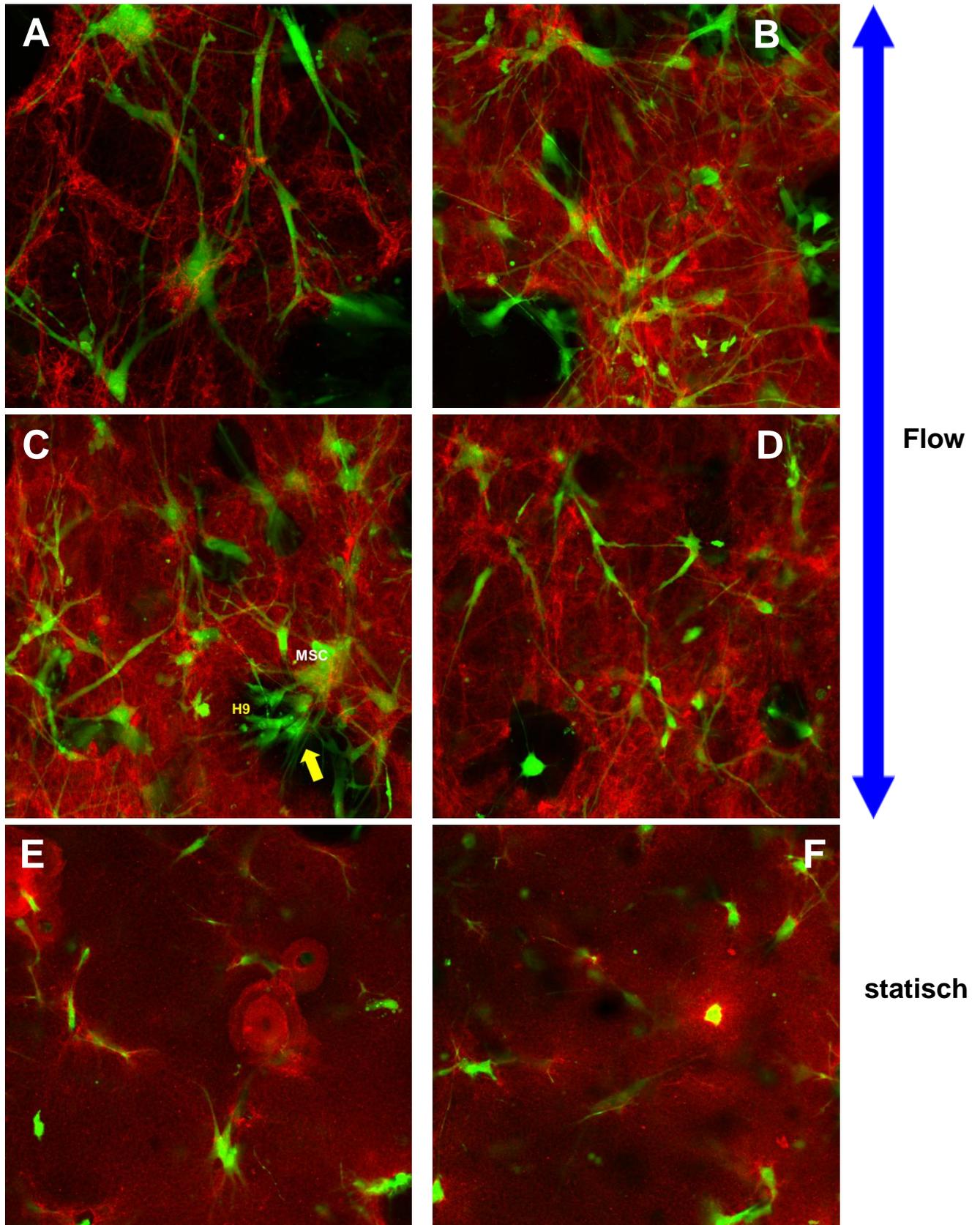


Abb. 66: Kokultur von MSC und H9-Zellen im Plasmaclot. A-D: Clotpolymerisation unter Flow auf dem Wippschüttler 60rpm. Rechter blauer Pfeil zeigt die Flow-Richtung. E-F: Clotpolymerisation statisch.

Durch den Einsatz von gelb-grün-fluoreszierenden Qtracker-Nanopartikeln konnten MSC von H9-Zellen in der Kokultur unterschieden werden. Abbildung 67 zeigt, dass die Qtracker-Nanopartikel von den MSC aufgenommen wurden und sich im Zytoplasma anreicherten.

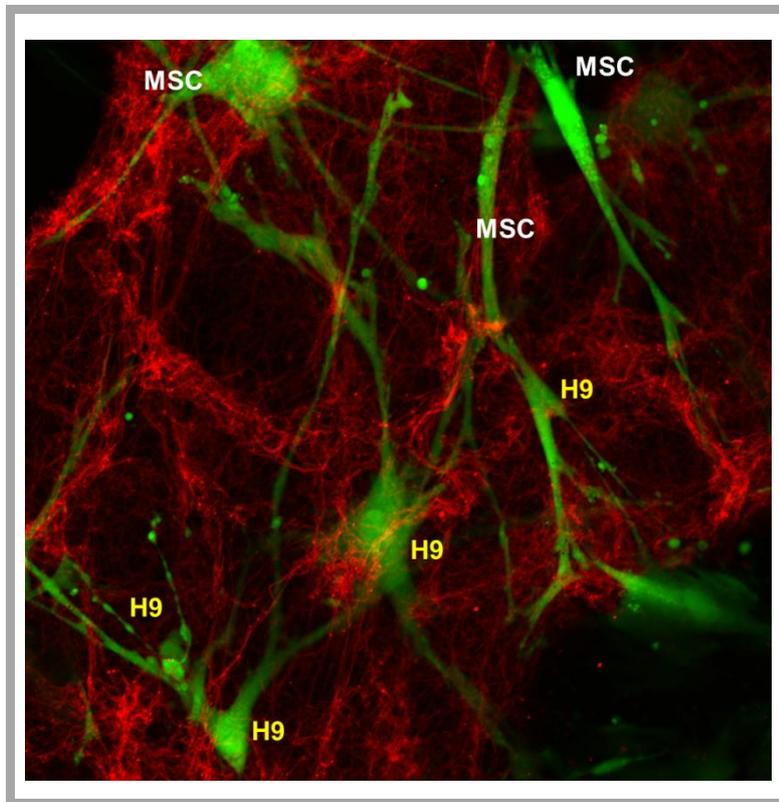


Abb. 67: Einsatz von Qtracker-565-Nanopartikeln zur Detektion von MSC in der Kokultur mit H9-Zellen im Plasmaclot.

4.11 3D-Chemotaxis Assay im selbst entwickelten Migrationsmodell

In dieser Studie wurde ein Migrationsmodell auf der Basis einer gerichteten bzw. einer ungerichteten Plasmaclot-Matrix zur Simulation einer Nervenleitschiene mit integrierten Fibrinfasern entwickelt und anhand von PMN sowie MSC und H9-Zellen etabliert. Hierbei stand insbesondere die Festlegung der Versuchsbedingungen zur Erzeugung reproduzierbarer Ergebnisse im Mittelpunkt. Die diffuse Ausbildung des Chemokingradienten in der Plasmaclot-Matrix wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran überprüft. Anschließend wurde die Sensitivität der Zellen auf unterschiedliche Faktoren analysiert und quantifiziert.

4.11.1 Farbstoffexperimente

4.11.1.1 Analyse der Farbstoff-Plasmaclot Interaktion

Vor den Farbstoffexperimenten wurde der verwendete Farbstoff FITC-Dextran auf mögliche Wechselwirkungen mit der Plasmaclot-Matrix und dem Acrylglas des Migrationsmodells geprüft. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass andere Faktoren als eine

Diffusionsbarriere in Form der gerichteten bzw. ungerichteten Fibrinfasern eine Einschränkung der Diffusion bewirken können. Für diese Versuche wurden die Plasmaclots in den Migrationskammern nach Polymerisation jeweils mit FITC-Dextran ($100\mu\text{M}$) überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Clots insgesamt dreimal hintereinander mit PBS gewaschen. Sofort nach jedem Waschschrift mit einer jeweils 30-minütigen Diffusionszeit wurde die Oberfläche der Plasmaclots mikroskopiert und die Fluoreszenzintensitäten des Farbstoffs ausgewertet.

Nach drei Waschschriften war an der Oberfläche von gerichteten sowie ungerichteten Plasmaclots kein Farbstoff mehr nachweisbar. FITC-Dextran konnte durch Diffusion ins PBS aus den Plasmaclots wieder gelöst werden. Auch am Acrylglas des Migrationsmodells war keine Farbstoffbindung nachweisbar. Somit konnten Interaktionen von FITC-Dextran mit der Plasmaclot-Matrix oder mit dem Material des Migrationsmodells ausgeschlossen werden.

4.11.1.2 LSM-Analyse des Diffusionsprofils von FITC-Dextran in Plasmaclots mit gerichteten und ungerichteten Fasern

Um die Diffusion der Gradientenausbildung in gerichteten (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm und 80 rpm) bzw. ungerichteten Plasmaclots (Clotpolymerisation: statisch) zu überprüfen, wurden zunächst die fluidischen Eigenschaften dieser Clots mittels Farbstoffexperimenten getestet. Als Farbstoff wurde hierbei FITC-Dextran eingesetzt.

Da Vorversuche mit niedrig konzentrierten Farbstofflösungen ($<100\mu\text{M}$) zeigten, dass die Fluoreszenzintensitäten zu gering für eine quantitative Detektion waren, wurde daher die Gradientenausbildung in den Clots nur mit $100\mu\text{M}$ FITC-Dextran nachgestellt.

Für die Farbstoffexperimente wurde FITC-Dextran nach der Clotpolymerisation in das Chemokinreservoir gegeben und die Gradientenausbildung und Stabilität des Farbstoffs zunächst stündlich mit dem MVX-Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert (Abb. 67 - 69).

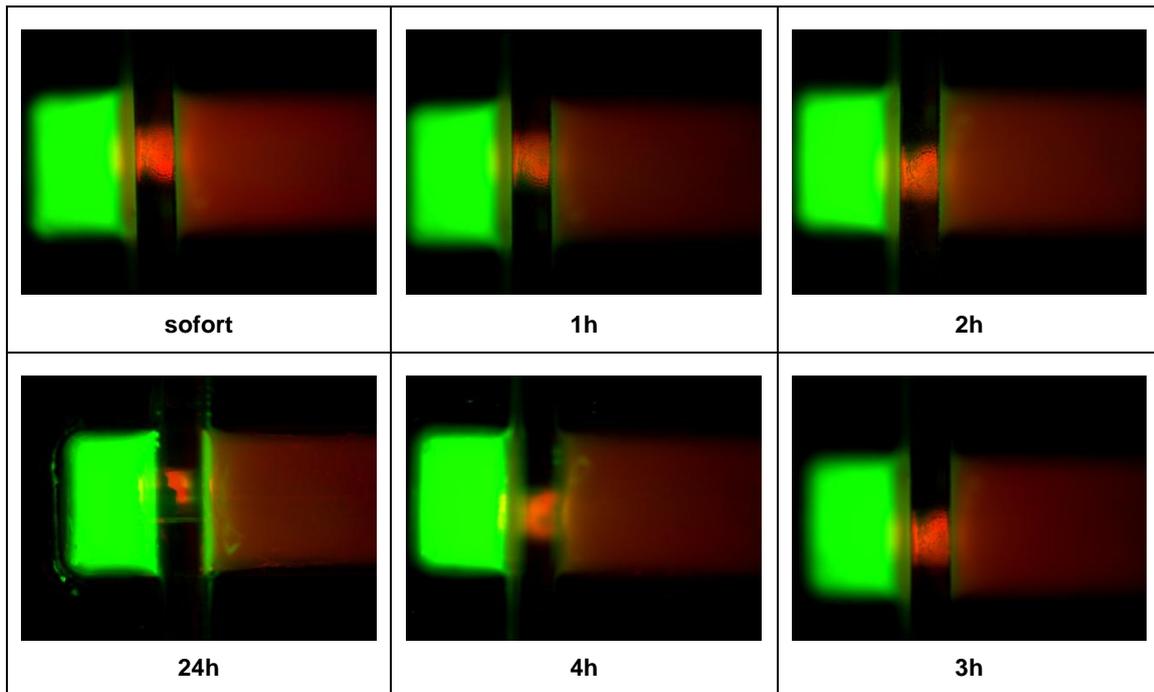


Abb. 67: Repräsentative Fluoreszenz-Aufnahmen zur Entwicklung des Farbstoffgradienten (grün) im gerichteten Plasmaclot (Polymerisation auf dem Wippschüttler: 60 rpm) im Zeitverlauf. Die Fibrinfasern der Clots wurden mit Alexa Flour 594 konjugiertem humanem Fibrinogen (rot) sichtbar gemacht. Vergrößerung: x0,63.

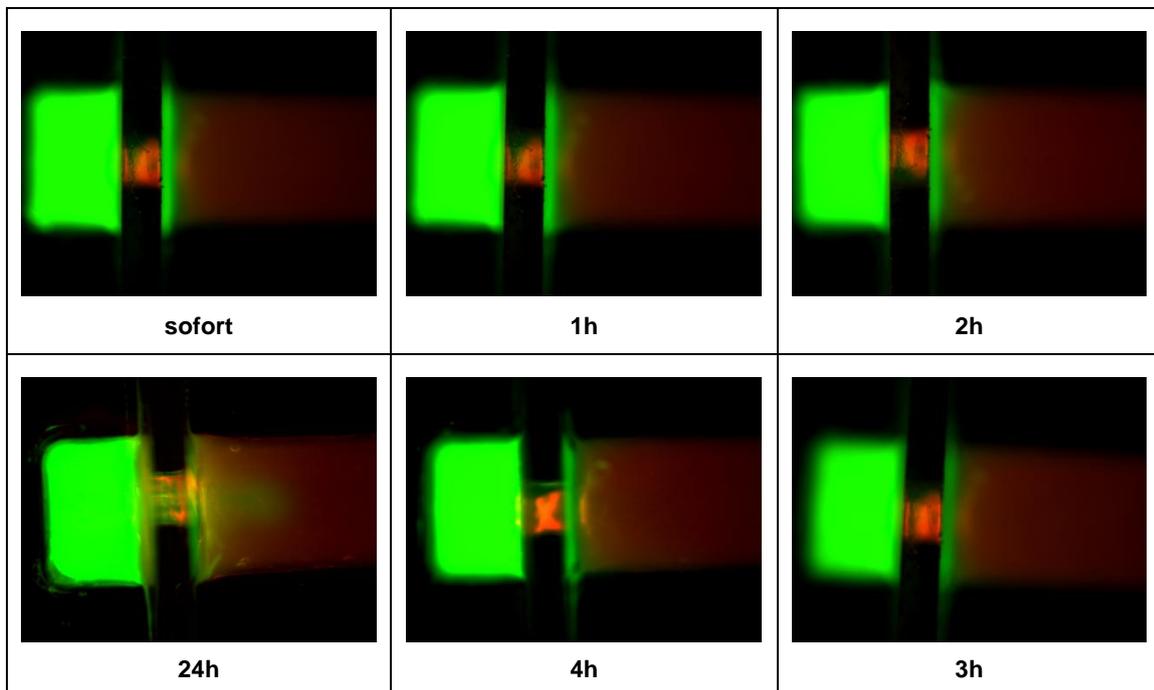


Abb. 68: Repräsentative Fluoreszenz-Aufnahmen zur Entwicklung des Farbstoffgradienten (grün) im gerichteten Plasmaclot (Polymerisation auf dem Wippschüttler: 80 rpm) im Zeitverlauf. Die Fibrinfasern der Clots wurden mit Alexa Flour 594 konjugiertem humanem Fibrinogen (rot) sichtbar gemacht. Vergrößerung: x0,63.

Die Abbildung 67 zeigt, dass sich nach Clot-Polymerisation auf dem Wippschüttler mit 60 rpm der Farbstoff in den ersten drei Stunden zunächst am Rand des Acrylglas-Schiebers verteilt. Erst nach 4h und 24h war der FITC-Dextran-Gradient im Clot gut erkennbar.

Nach Clot-Polymerisation auf dem Wippschüttler mit 80 rpm wurden ein breiter Farbstoffstreifen am Rand des Acrylglas-Schiebers und ein beginnender FITC-Dextran-Gradient im Clot sichtbar. Erwartungsgemäß stellte sich der Dextran-Gradient im Clot nach 4h langsam ein und erreichte nach 24h sein Maximum (Abb. 68).

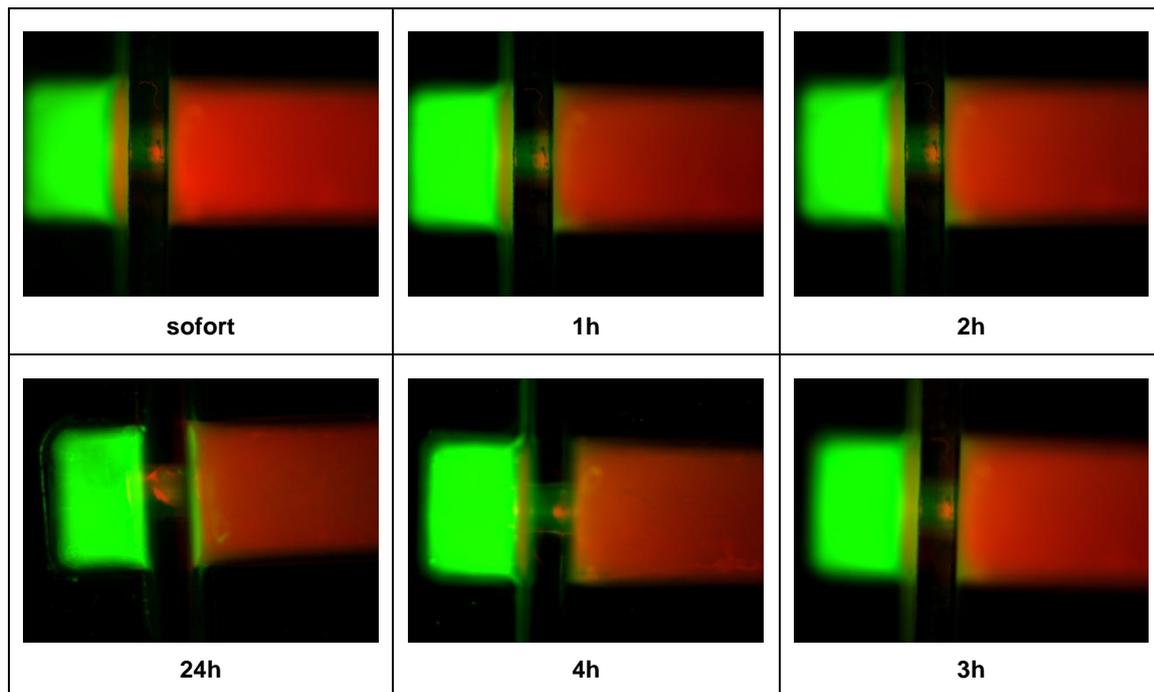


Abb. 69: Repräsentative Fluoreszenz-Aufnahmen zur Entwicklung des Farbstoffgradienten (grün) im ungerichteten Plasmaclot (Polymerisation: statisch) im Zeitverlauf. Die Fibrinfasern der Clots wurden mit Alexa Fluor 594 konjugiertem humanem Fibrinogen (rot) sichtbar gemacht. Vergrößerung: x0,63

Im Vergleich zu Clots mit ausgerichteten Fibrinfasern zeigte sich bei ungerichteten Clots nur ein sehr schmaler Farbstoffstreifen am Rand des Acrylglas-Schiebers, der erst nach 24h etwas breiter wurde. Nur ein sehr schwacher FITC-Dextran-Gradient konnte nach 24h beobachtet werden (Abb. 69).

Nach 24h wurde der Konzentrationsausgleich im Clot nach 24h genauer mittels LSM-Analyse mit anschließender Messung der Fluoreszenzintensitäten untersucht. Ausgewertet wurde hierbei der Verlauf des FITC-Dextran-Gradienten in den unterschiedlich hergestellten Clots an fünf vorher festgelegten Messpositionen (Abb. 70 – 72).

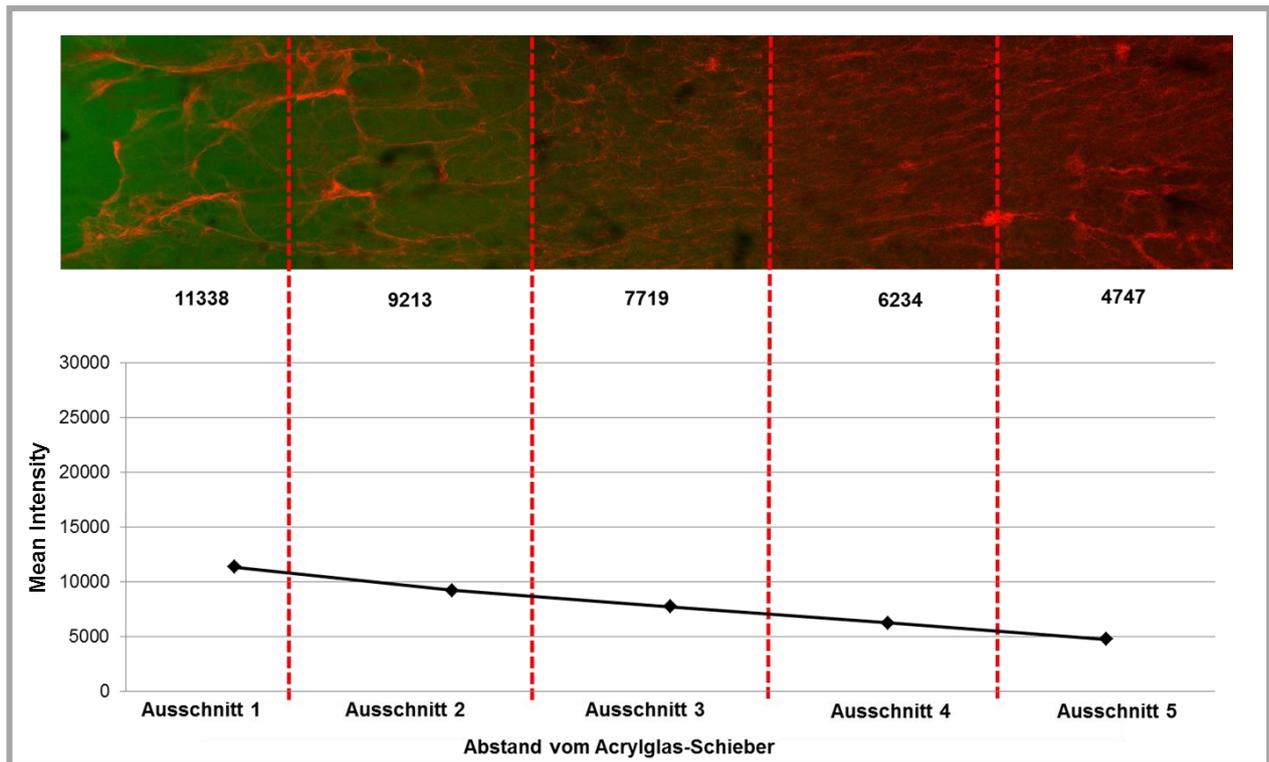


Abb. 70: Darstellung der Datenanalyse durch LSM-Messungen. Die roten gestrichelten Linien markieren die einzelnen Ausschnitte von der erstellten Bildserie, beginnend direkt am Acrylglas-Schieber (Loch). Der Graph zeigt den Verlauf des Farbstoffgradienten in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) in den fünf festgelegten Ausschnitten nach einer Inkubationszeit von 24h.

Der Gradientenverlauf wies in Clots nach Fibrinfaserausrichtung unter Flow auf dem Wippschüttler mit einer Wippsgeschwindigkeit von 60 rpm in der Beobachtungsregion im Abstand vom Acrylglas-Schieber (Loch) zum Kammermittelpunkt ein leicht abfallendes Konzentrationsprofil auf (Abb. 70).

Wurde die Wippsgeschwindigkeit bei der Clotpolymerisation auf 80 rpm erhöht, wurden doppelt so hohe Fluoreszenzintensitäten gemessen. Der Gradient zeigte hier in den ersten drei Abschnitten einen annähernd konstanten Verlauf. Im vierten und fünften Abschnitt war ein Abflachen des Gradientenprofils in Folge des Konzentrationsausgleichs zu beobachten (Abb. 71).

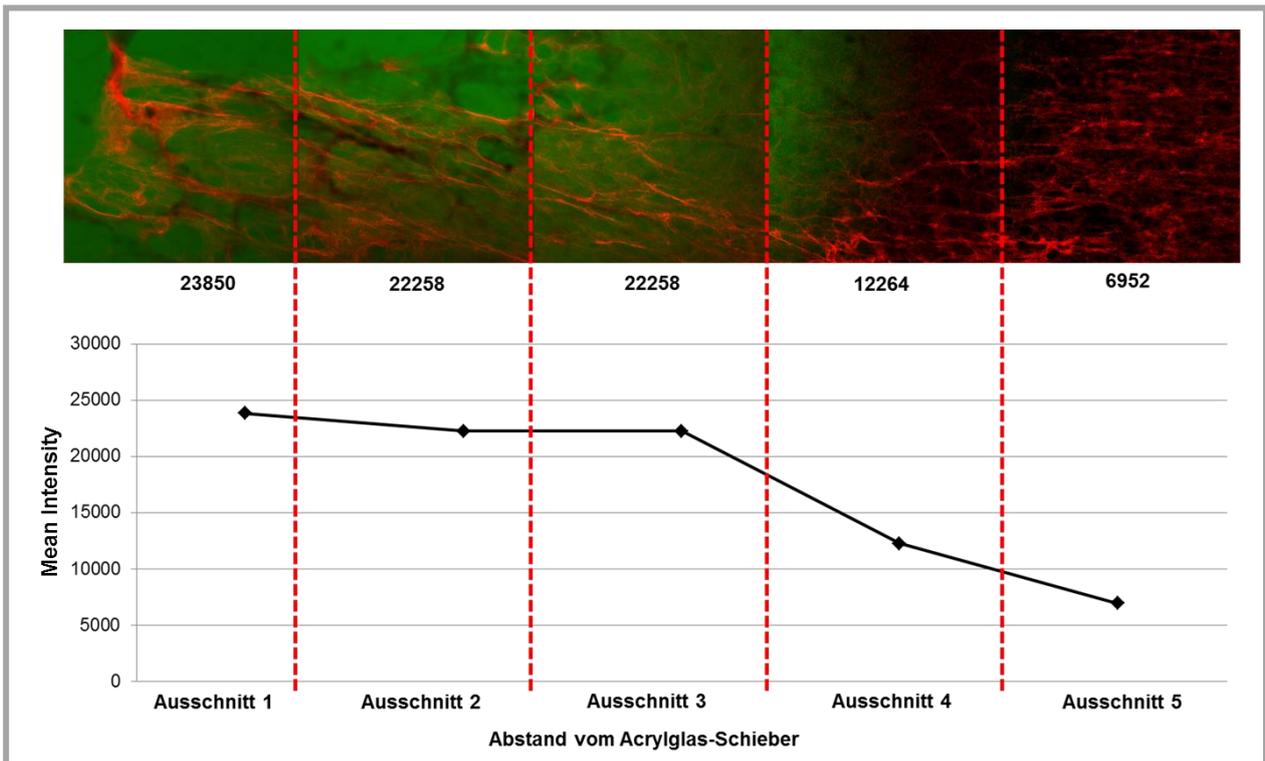


Abb. 71: Darstellung der Datenanalyse durch LSM-Messungen. Die roten gestrichelten Linien markieren die einzelnen Ausschnitte von der erstellten Bildserie, beginnend direkt am Acrylglas-Schieber (Loch). Der Graph zeigt den Verlauf des Farbstoffgradienten in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 80 rpm) in den fünf festgelegten Ausschnitten nach einer Inkubationszeit von 24h.

Im Vergleich zu Clots mit gerichteten Fibrinfasern blieb der Gradient bei Clots mit ungerichteten Fasern in den gemessenen fünf Abschnitten nahezu konstant. Ein Konzentrationsausgleich konnte nicht beobachtet werden (Abb. 72).

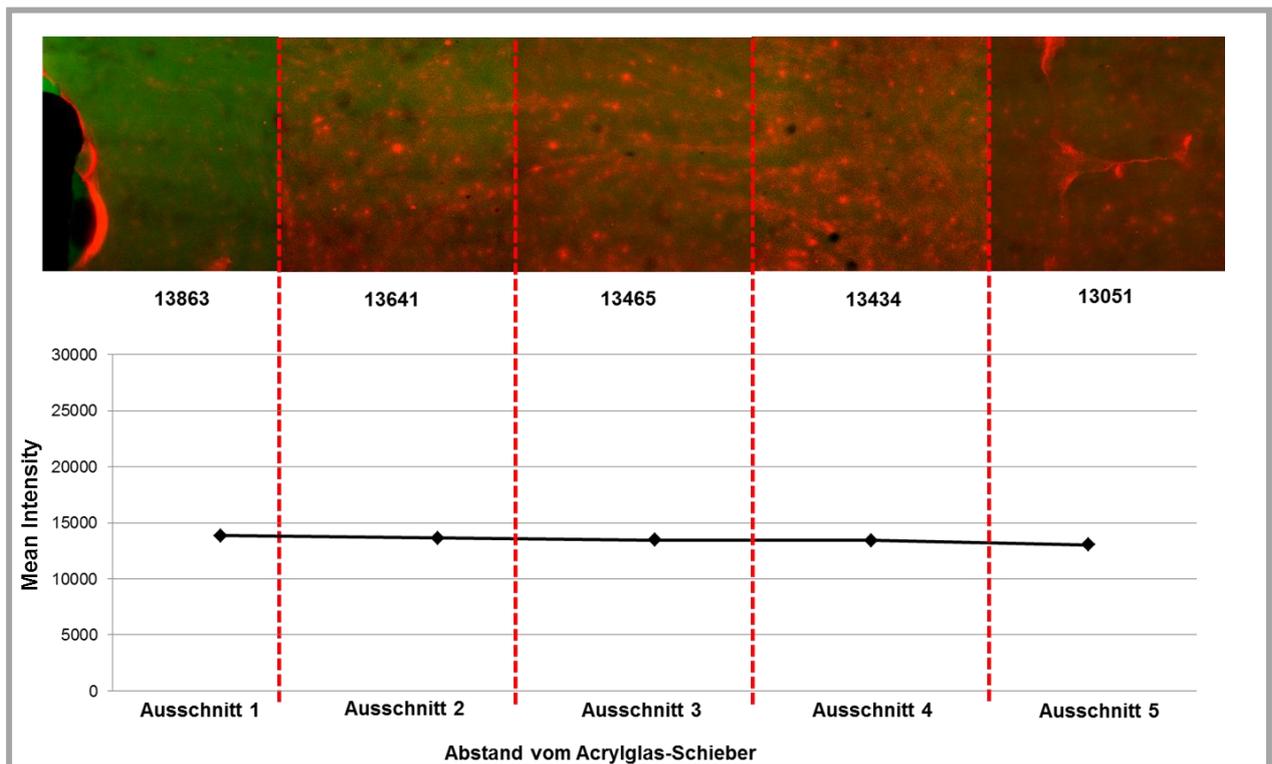


Abb. 72: Darstellung der Datenanalyse durch LSM-Messungen. Die roten gestrichelten Linien markieren die einzelnen Ausschnitte von der erstellten Bildserie, beginnend direkt am Acrylglas-Schieber (Loch). Der Graph zeigt den Verlauf des Farbstoffgradienten in einem ungerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation: statisch) in den fünf festgelegten Ausschnitten nach einer Inkubationszeit von 24h.

Abbildung 73 zeigt den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von FITC-Dextran in gerichteten Plasmaclots (Polymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm und 80 rpm) versus im ungerichteten Clot (Polymerisation: statisch).

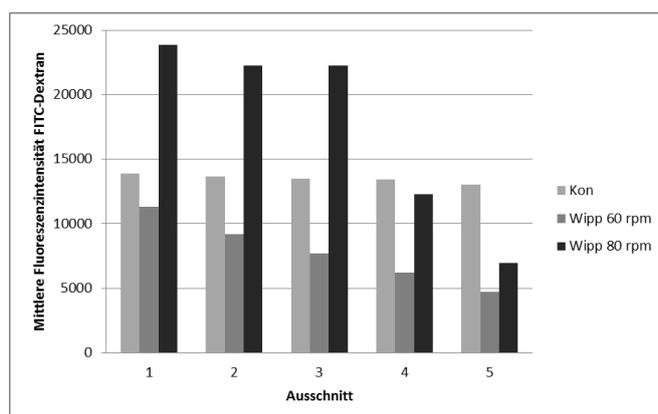


Abb. 73: Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten von FITC-Dextran in den unterschiedlichen Plasmaclot nach 24h.

Nach 48h waren die Fluoreszenzintensitäten nahezu unverändert, und somit konnte der Gradient für den Zeitraum der Dauer eines Migrationsversuches (48h) als stationär betrachtet werden.

Zusammengefasst haben diese Farbstoffexperimente und die Messungen zur Gradientenausbildung und –stabilität gezeigt, dass sich nach Befüllen des Chemokin-Reservoirs über Diffusion ein Konzentrationsgefälle von FITC-Dextran im Clot-Reservoir aufbaut. Die Entwicklung des Diffusionsprofils ist hierbei sowohl von der Versuchsdauer als auch von der verwendeten Plasmaclot-Matrix (gerichtet / ungerichtet) abhängig. Anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten konnte gezeigt werden, dass sich die Gradientensteilheit beim Übergang von Farbstoff-Reservoir in das Clot-Reservoir und in die Fibrinnetzstruktur änderte.

4.11.2 Migration von neutrophilen Granulozyten in der Plasmaclot-Matrix

Neutrophile Granulozyten sind schnell migrierende Zellen und werden daher oft in Migrationsversuchen eingesetzt. Da ihr chemotaktisches Verhalten bereits gegen IL-8 gut untersucht wurde, stellten sie ein optimales Modellsystem zur Testung des hier vorgestellten Migrationsmodells dar.

Nach einer Inkubationszeit von 24h migrierte ein Anteil von ca. 77,5% aller Zellen in dem ausgewählten Ausschnitt eindeutig in Richtung des IL-8-Clots (Abb. 74A). Dagegen wiesen sie keine chemotaktische Aktivität in Richtung Kontrollclot auf. Hier betrug der Anteil der migrierten Zellen nur 10,6% (Abb. 74B).

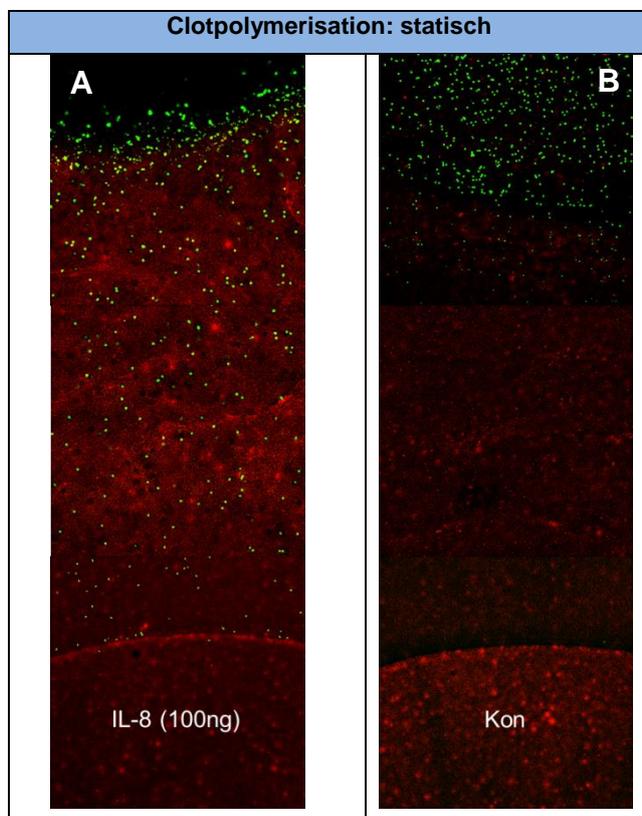


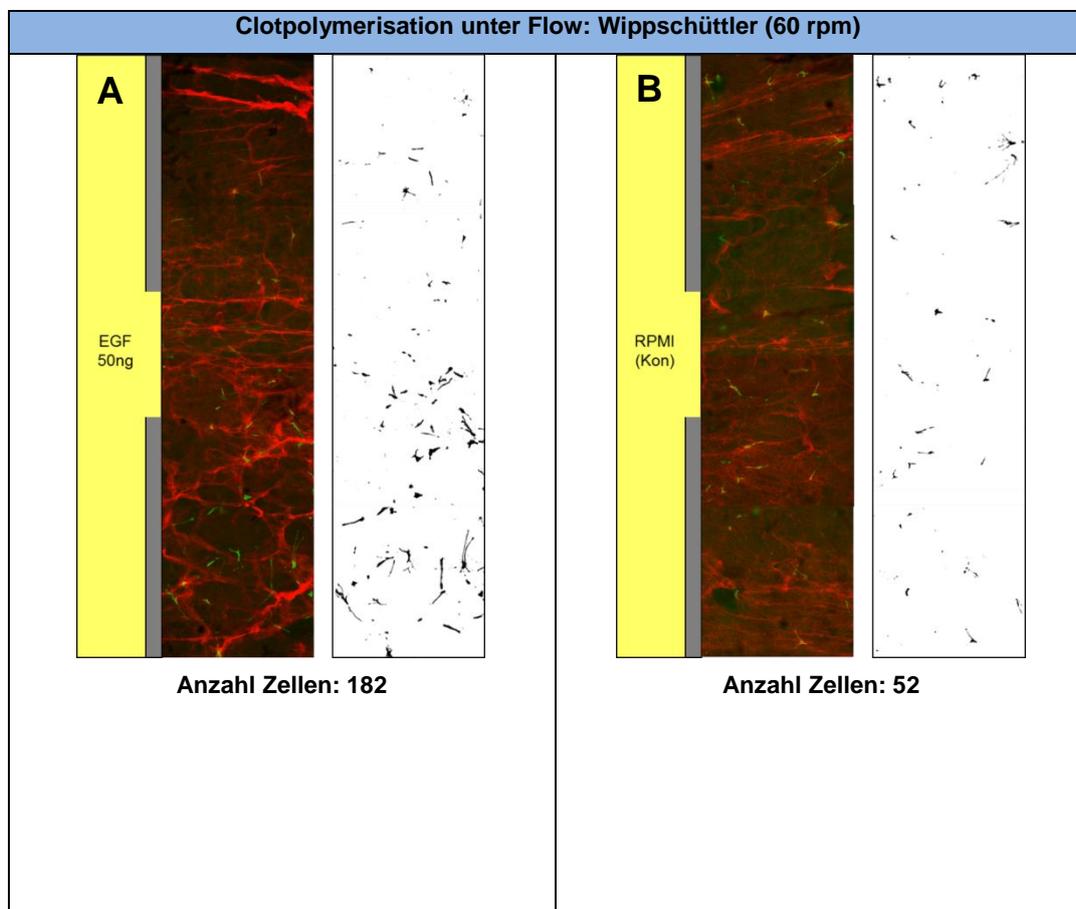
Abb. 74: Einfluss von IL-8 auf die Zellmigration von PMN in einer ungerichteten Plasmaclot-Matrix (A) im Vergleich zu einem Kontrollclot ohne IL-8 (B).

Obwohl PMN als Modell für chemotaktische Migration in der Plasmaclot-Matrix geeignet war, wurden keine weiteren Chemotaxisexperimente mit PMN durchgeführt, da die Versuchsanordnung nicht mit der von MSC und H9-Zellen vergleichbar war. Die isolierten PMNs konnten nicht wie die beiden anderen Zelltypen in die Clotmatrix eingebettet werden, da nach der Koagulation ein großer Anteil der Zellen nicht mehr viabel war (Vorversuche). Zusätzlich muss auch bemerkt werden, dass erstens das Einpipettieren der PMN in die Clotmatrix äußerst schwierig war und zweitens die Auswertung der Zellmigration aufgrund der runden Einstichstelle nicht vereinfacht werden konnte.

4.11.4 Chemotaktische Migration von MSC im Migrationsmodell

Da die CI-Werte der Wachstumsfaktoren EGF, PDGF-BB, HGF und des Zytokins SDF-1 im FluoroBlok-Chemotaxis Assay die höchsten Werte aufwiesen und die Zellmigration von MSC signifikant zur Negativkontrolle stimulierten, wurden diese Faktoren für die Chemotaxisexperimente in der Migrationskammer eingesetzt.

Die Abbildungen 75 - 78 zeigen beispielhaft die Migration von MSC in Reaktion auf diese ausgewählten chemotaktischen Faktoren in einer ausgerichteten Clot-Matrix im Vergleich zur Negativkontrolle sowie zur Chemotaxis in einer ungerichteten Clot-Matrix.



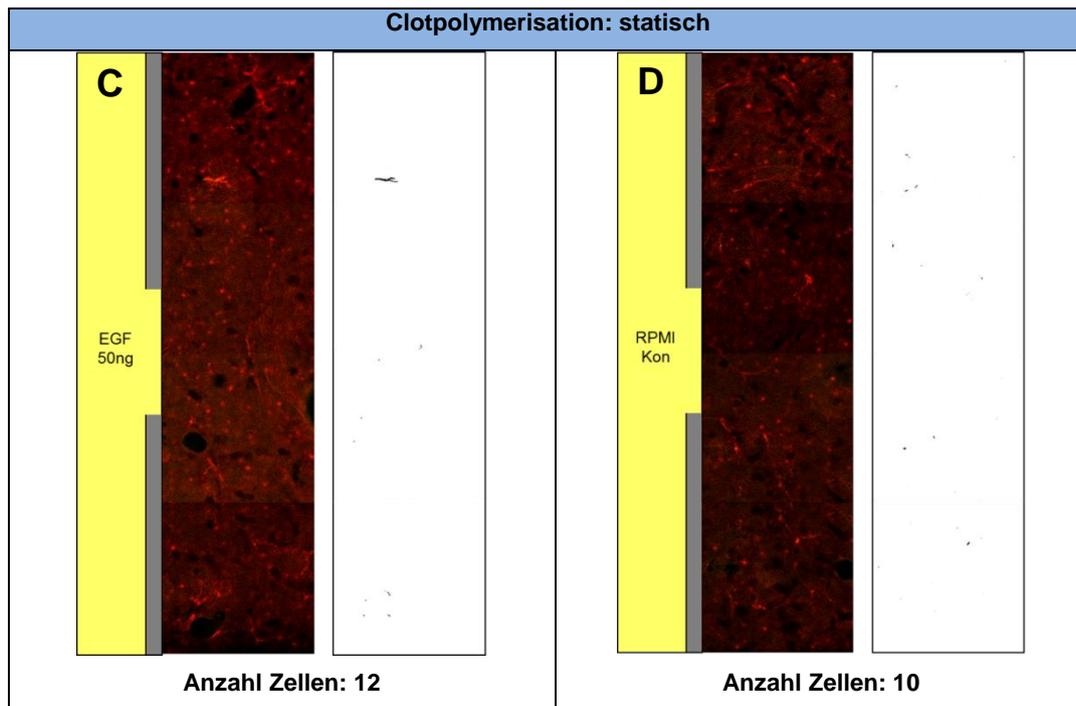


Abb. 75: Chemotaktische Antwort der MSC auf EGF (50ng) im Migrationsmodell. A: in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) im Vergleich zu C: in einem ungerichteten Clot (Clotpolymerisation: statisch). B und D: dazu korrespondierende Negativkontrollen.

Die in Abbildung 75 dargestellten Migrationsmuster zeigen für das Chemotaxisexperiment mit EGF (50ng) in einer ausgerichteten Clot-Matrix (Abb. 75A) im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 75B) sowie zur Chemotaxis in einer ungerichteten Clot-Matrix (Abb. 75C und D) nur eine schwache Tendenz der Zellbewegung in Richtung EGF-Reservoir.

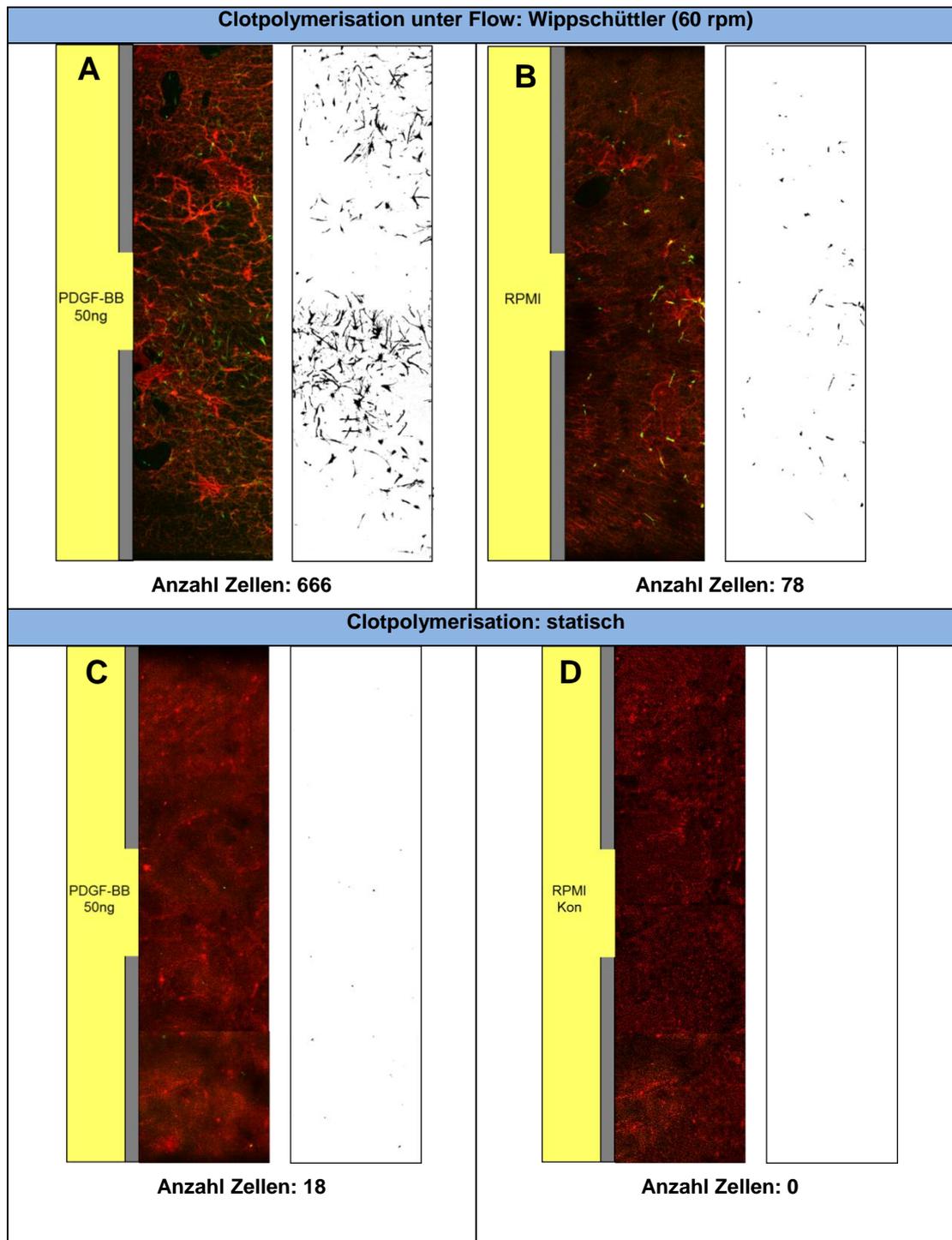


Abb. 76: Einfluss von PDGF-BB (50ng) auf die Zellmigration von MSC im Migrationsmodell. **A:** in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) im Vergleich zu **C:** in einem ungerichteten Clot (Clotpolymerisation: statisch). **B** und **D:** dazu korrespondierende Negativkontrollen.

Abbildung 76A zeigt in einer gerichteten Clot-Matrix eine Vorzugsrichtung der Zellen in Reaktion auf den PDGF-BB-Gradienten im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 76B). In einer ungerichteten Clot-Matrix bewegten sich die MSC dagegen ungerichtet ohne

erkennbare Vorzugsrichtung sowohl in Reaktion auf PDGF-BB als auch in der Negativkontrolle (Abb. 76C und D). Die Form der Zellen war im Plasmaclot mit ungerichteten Fibrinfasern (Clotpolymerisation: statisch) rundlich (Abb. 76C und D), dagegen in der gerichteten Clot-Matrix (Clotpolymerisation unter Flow) langgezogen und spindelförmig (Abb. 76 A und B).

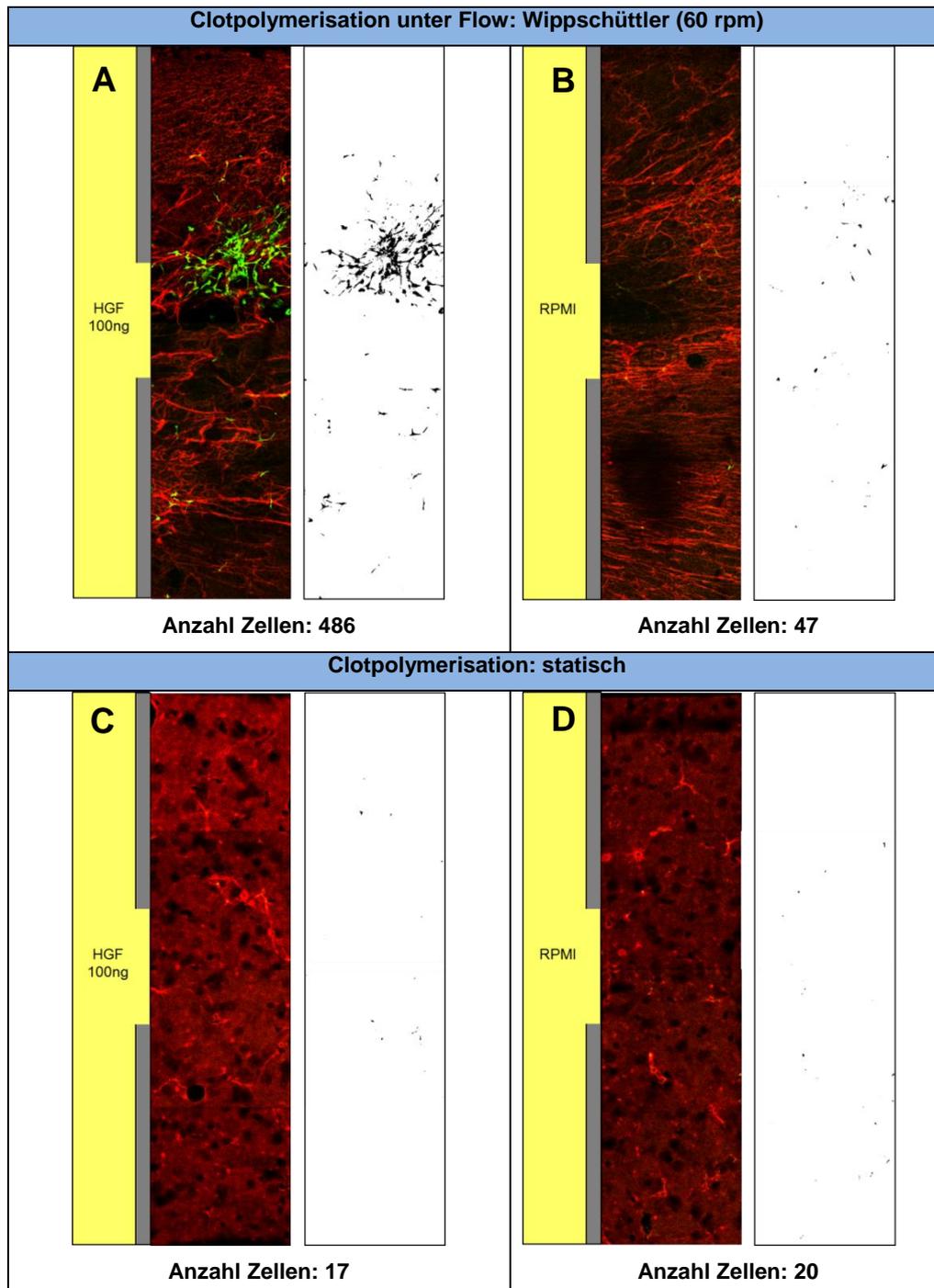


Abb. 77: Chemotaktische Antwort der MSC auf HGF (100ng) im Migrationsmodell. A: in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) im Vergleich zu C: in einem ungerichteten Clot (Clotpolymerisation: statisch). B und D: dazu korrespondierende Negativkontrollen.

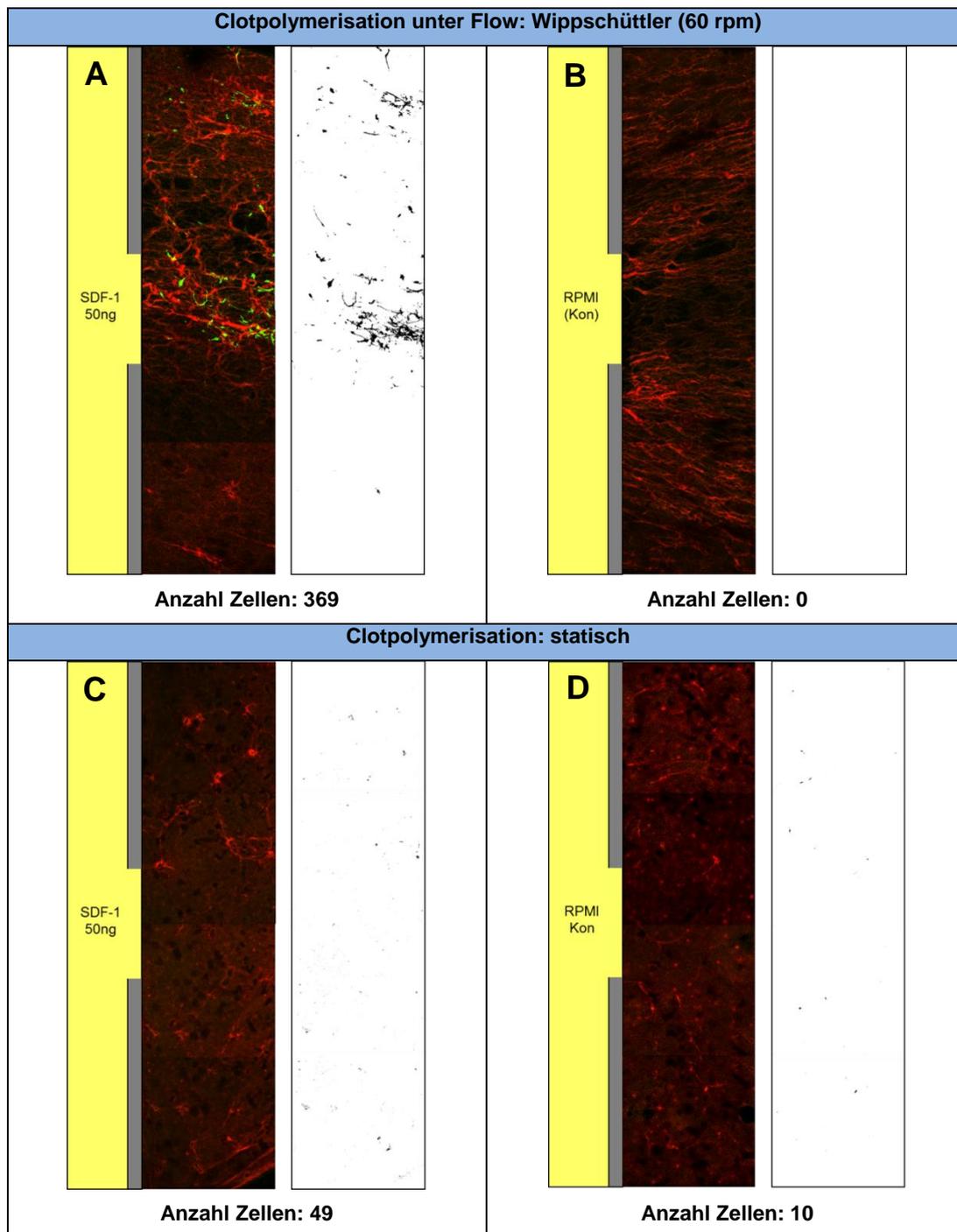


Abb. 78: Chemotaktische Migration von MSC, induziert von SDF-1 (50ng), im Migrationsmodell. A: in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) im Vergleich zu C: in einem ungerichteten Clot (Clotpolymerisation: statisch). B und D: dazu korrespondierende Negativkontrollen.

Aus den in Abbildung 77 dargestellten Migrationsmustern lässt sich für das Chemotaxis-experiment mit HGF (100ng) in einer ausgerichteten Clot-Matrix (Abb. 77A) im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 77B) sowie zur Chemotaxis in einer ungerichteten Clot-Matrix (Abb.

77C und D) eine starke Tendenz der Zellbewegung in Richtung HGF-Reservoir erkennen. Auch hier wurde der Unterschied in der Zellmorphologie bestätigt. Im Plasmaclot mit längs orientierten Fibrinfasern wiesen die MSC eine langgestreckte, spindelförmige Form auf und die Fortsätze, mit denen sich die Zellen in dem umgebenden Clot orientierten und festhielten, waren deutlich erkennbar (Abb. 77A und B). Dagegen zeigten MSC im Plasmaclot mit ungerichteten Fasern eine rundliche Morphologie (Abb. 77C und D)..

Abbildung 78A zeigt in einer gerichteten Clot-Matrix eine Vorzugsrichtung der Zellen in Reaktion auf den SDF-1-Gradienten im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 78B). In einer ungerichteten Clot-Matrix bewegten sich die MSC dagegen ungerichtet ohne erkennbare Vorzugsrichtung sowohl in Reaktion auf SDF-1 als auch in der Negativkontrolle (Abb. 78C und D). Auch hier war im Vergleich zum Kontrollclot (statisch) in der längs orientierten Clotmatrix die Form der MSC langgezogen und spindelförmig (Abb. 78A).

Um bestimmen zu können, ob Unterschiede im Migrationsverhalten der MSC im gerichteten und ungerichteten Clot auftraten, wurde für alle Chemotaxisversuche die Zellzahl berechnet und in Tabelle 19 zusammengefasst. Anhand der Zellzahl konnten die durchgeführten Versuche gut miteinander verglichen und auf ihre Reproduzierbarkeit geprüft werden.

Tabelle 19: Anzahl der migrierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. (n = 3 unabhängige Versuche).

	Clot-Polymerisation unter Flow (Wipp 60rpm)	Clot-Polymerisation statisch
Kontrolle	52 \pm 3	13 \pm 2
EGF (50ng)	193 \pm 8	16 \pm 3
PDGF-BB (50ng)	696 \pm 24	18 \pm 2
HGF (100ng)	501 \pm 11	17 \pm 1
SDF-1 (50ng)	391 \pm 16	16 \pm 1

Beim Vergleich der migrierten Zellen konnten mittels 1-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche hoch signifikante Unterschiede zwischen allen Faktoren und der dazugehörigen Negativkontrolle sowie untereinander aufgezeigt werden (Tab. 20).

Tab. 20: Analyse der Signifikanz ($p < 0,05$) mittels 1-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche.

Clot-Polymerisation unter Flow (Wipp 60rpm)					
	Kon	EGF	PDGF-BB	HGF	SDF-1
Kon		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
EGF	$p < 0,001$		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
PDGF-BB	$p < 0,001$	$p < 0,001$		$p < 0,001$	$p < 0,001$
HGF	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$		$p < 0,01$
SDF-1	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,01$	

Zusätzlich wurde die Zellmigration über den Chemotaxis Index (CI) berechnet und die erhaltenen CI-Werte wurden mit den CI-Werten aus dem Transwell-System verglichen (Tab. 21). Die CI-Werte der Wachstumsfaktoren PDGF-BB und HGF zeigten in beiden Chemotaxis-Systemen die höchsten Werte. Die Korrelation nach Pearson zeigte einen hohen Korrelationskoeffizienten ($r = 0,9330$), war aber nicht signifikant. Insgesamt konnte bei allen Transwell-Experimenten eine höhere Migrationsrate als beim Migrationsmodell beobachtet werden.

Tab. 21: Vergleich der Chemotaxis Indices (CI) von EGF, PDGF-BB, HGF und SDF-1 der beiden unterschiedlichen Chemotaxis-Systeme.

	Migrationsmodell	Transwell-System
EGF	2,7	11,8
PDGF-BB	12,4	32,7
HGF	8,6	18,9
SDF-1	6,5	13,9

4.11.5 Migration von H9-Zellen im Migrationsmodell

Da die CI-Werte der Wachstumsfaktoren VEGF 165, IGF-I, PDGF-BB, FGF-9 sowie des Zytokins SDF-1 und des neuronalen Faktors CNTF im FluoroBlok-Chemotaxis Assay die höchsten Werte zeigten und die Zellmigration von H9-Zellen signifikant zur Negativkontrolle stimulierten, wurden diese Faktoren für die Chemotaxisexperimente in der Migrationskammer verwendet.

Die Abbildungen 79 - 84 zeigen beispielhaft die Migration von H9-Zellen in Reaktion auf diese ausgewählten chemotaktischen Faktoren in einer ausgerichteten Clot-Matrix im Vergleich zur Negativkontrolle sowie zur Chemotaxis in einer ungerichteten Clot-Matrix.

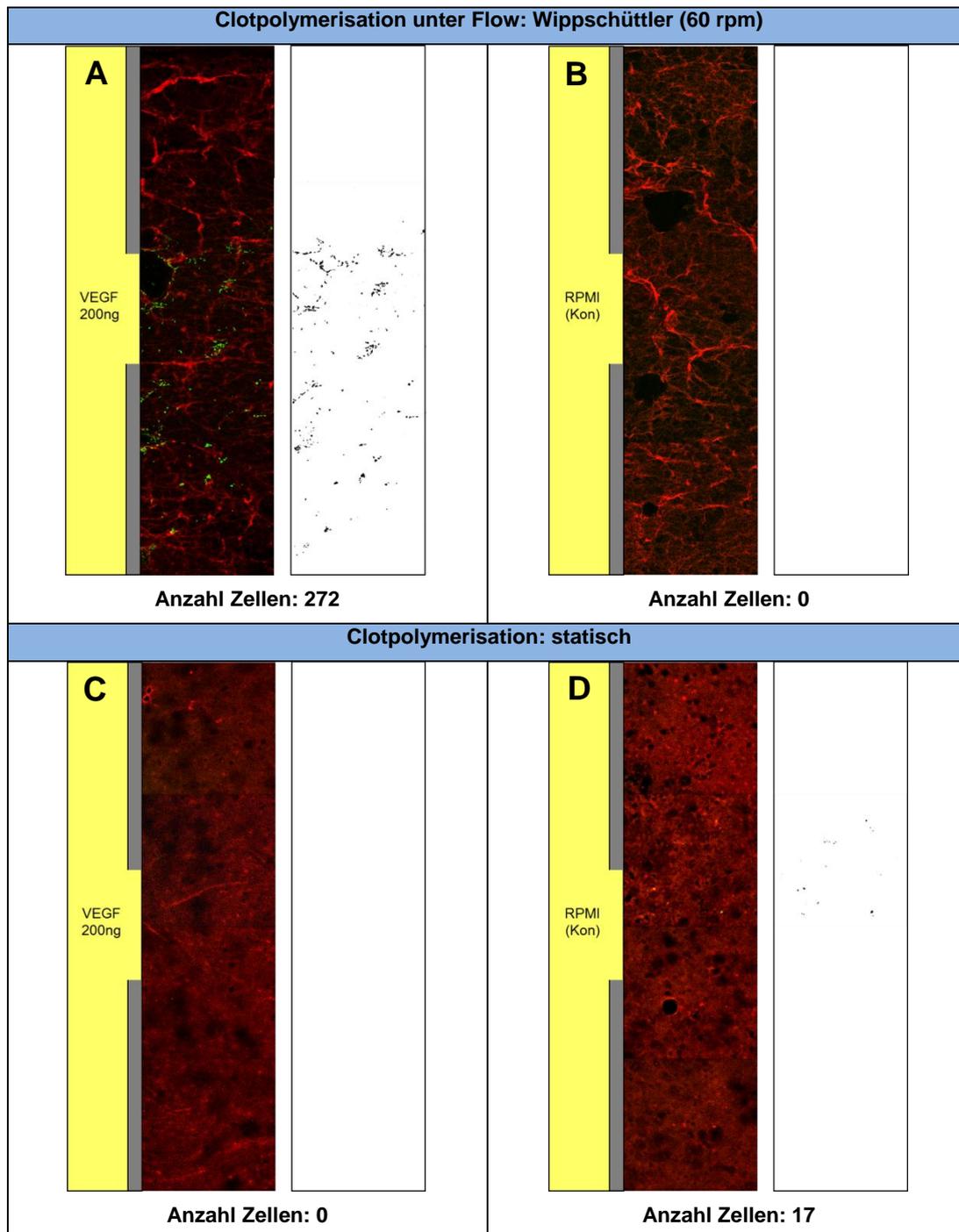


Abb. 79: Effekt von VEGF 165 (200ng) auf die chemotaktische Migration von H9-Zellen im Migrationsmodell. A: in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) im Vergleich zu C: in einem ungerichteten Clot (Clotpolymerisation: statisch). B und D: dazu korrespondierende Negativkontrollen.

VEGF induzierte nur in der gerichteten Clot-Matrix eine erhöhte chemotaktische Zellmigration im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 79A und B) sowie zur Chemotaxis in einer ungerichteten Clot-Matrix (Abb. 79C und D). Im ungerichteten Plasmaclot wiesen die H9-Zellen eine geringe Basismotilität in der Negativkontrolle auf (Abb. 79D).

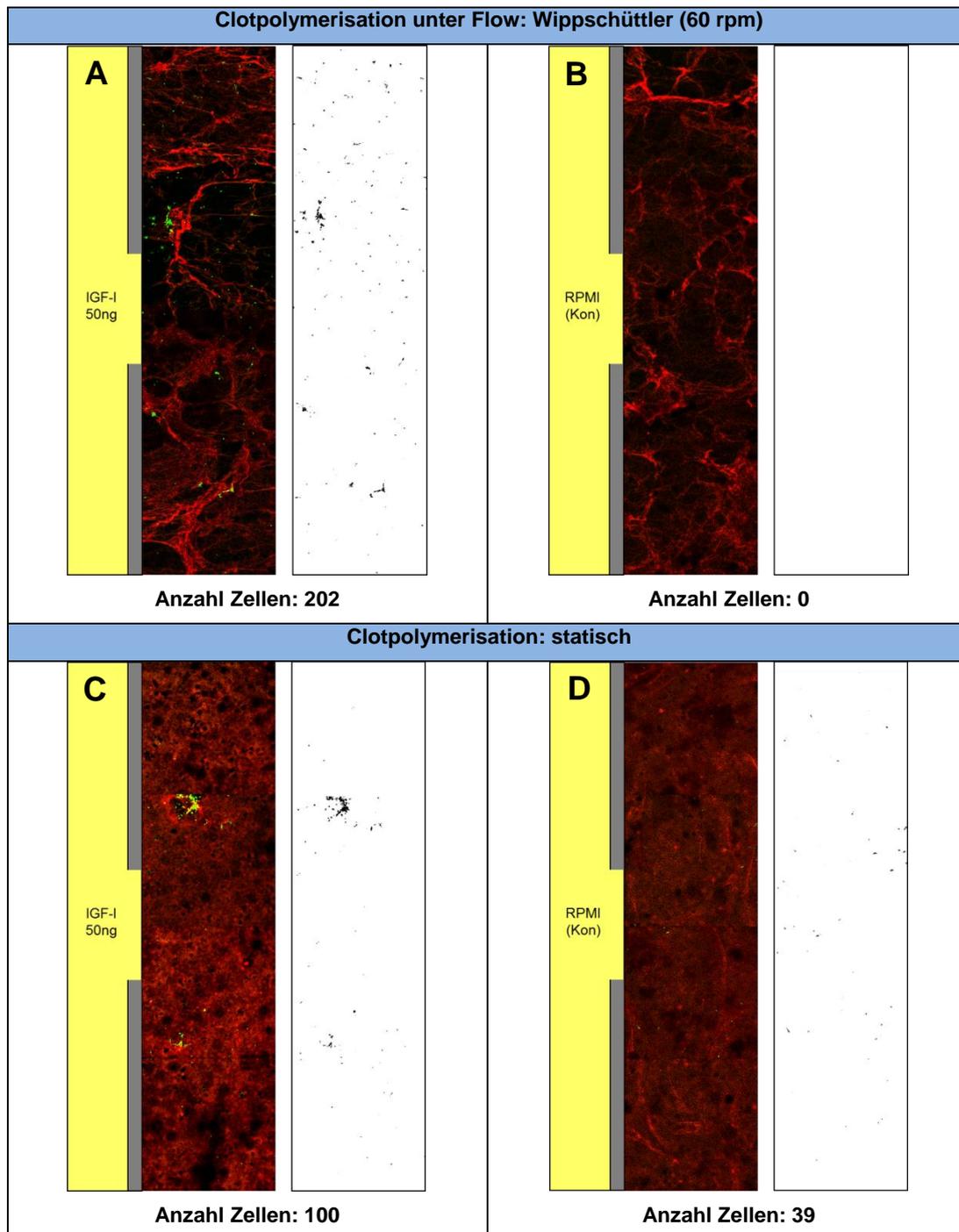


Abb. 80: Chemotaktische Antwort der H9-Zellen auf IGF-I (50ng) im Migrationsmodell. A: in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) im Vergleich zu C: in einem ungerichteten Clot (Clotpolymerisation: statisch). B und D: dazu korrespondierende Negativkontrollen.

Abbildung 80A zeigt in einer gerichteten Clot-Matrix eine Vorzugsrichtung der Zellen in Reaktion auf den IGF-I-Gradienten im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 80B). In einer ungerichteten Clot-Matrix wiesen die H9-Zellen eine Basismotilität auf, obwohl kein chemotaktischer Stimulus vorhanden war (Abb. 80D). Durch chemotaktische Stimulation mit

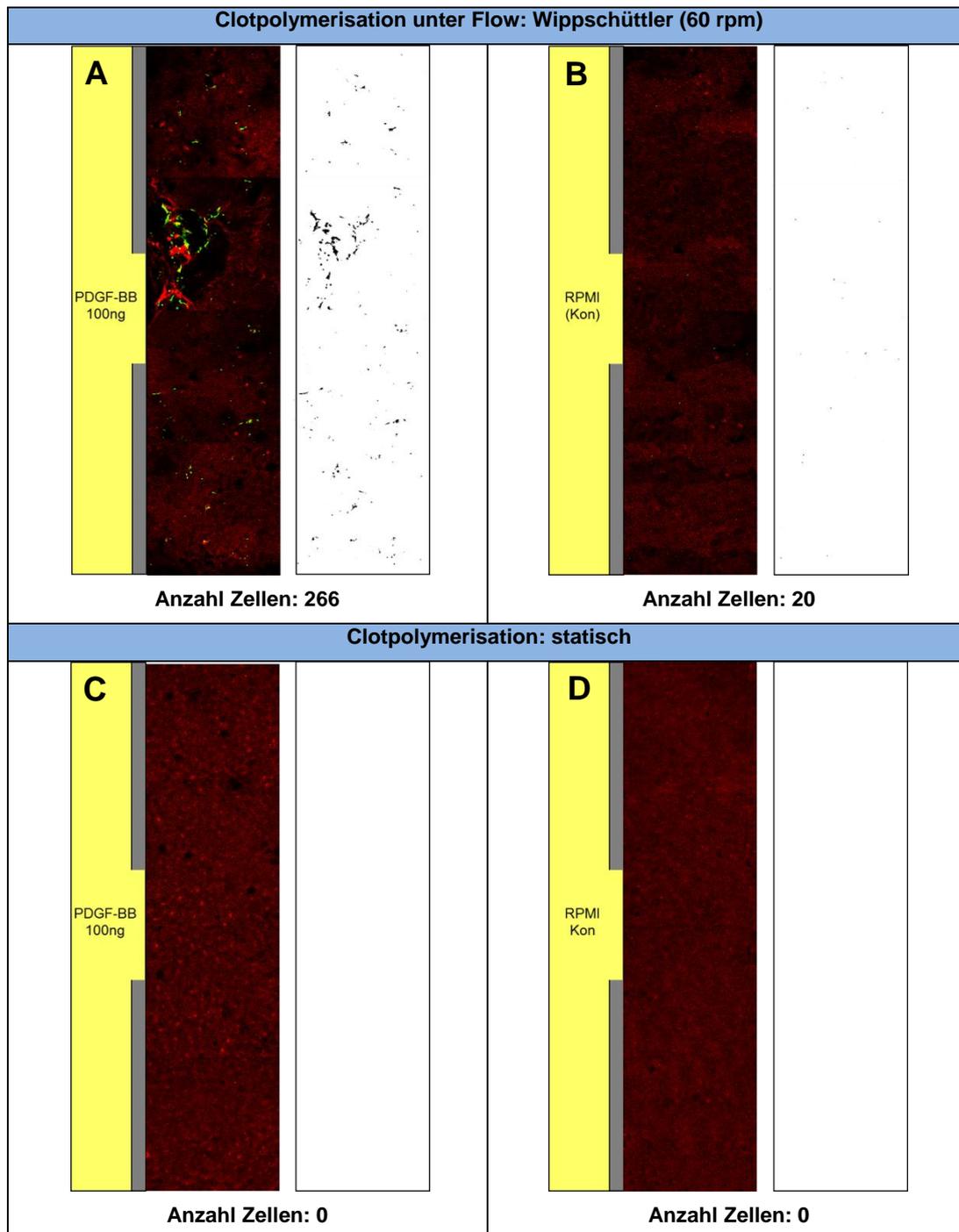


Abb. 81: PDGF-stimulierte Zellmigration der H9-Zellen im Migrationsmodell. A: in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) im Vergleich zu C: in einem ungerichteten Clot (Clotpolymerisation: statisch). B und D: dazu korrespondierende Negativkontrollen.

IGF-I wurde diese Basismotilität gesteigert (Abb. xC). Im Vergleich zur gerichteten Clot-Matrix bewegten sich die H9-Zellen ungerichtet ohne Vorzugsrichtung sowohl in Reaktion auf IGF-I als auch in der Negativkontrolle (Abb. 80C und D)

Im Plasmaclot mit längs orientierten Fibrinfasern wiesen die H9-Zellen eine längliche Form mit langgestreckten Fortsätzen auf, mit denen sich die Zellen an den Fibrinfasern orientierten

und festhielten (Abb. 80A). Dagegen zeigten die H9-Zellen im Plasmaclot mit ungerichteten Fasern eine rundliche Morphologie mit kurzen Fortsätzen (Abb. 80C und D).

Während PDGF-BB nach einer Inkubationszeit von 48h ein gesteigertes Migrationsverhalten der H9-Zellen in einem gerichteten Plasmaclot induzierte, zeigte PDGF-BB keinen Effekt in einem ungerichteten Clot. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 81B) war eine linksgerichtete Tendenz der Zellbewegung erkennbar (Abb. 81A). Im Plasmaclot mit längs orientierten Fibrinfasern wiesen die Zellen eine langgestreckte Form auf und bildeten lange Fortsätze mit denen sie sich an den Fibrinfasern festhielten (Abb. 81A).

Abbildung 82A zeigt in einer gerichteten Clot-Matrix eine Vorzugsrichtung der H9-Zellen in Reaktion auf den FGF-9-Gradienten im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 82B) sowie zur Chemotaxis in einer ungerichteten Clot-Matrix (Abb. 82C und D). Die Morphologie der Zellen war im Plasmaclot mit gerichteten Fibrinfasern (Clotpolymerisation unter Flow) langgestreckt und teilweise spindelförmig (Abb. 82A und B). Auffallend war auch, dass die Zellen in Formationen von vier bis zehn Zellen in Richtung FGF-9-Reservoir wanderten.

Die H9-Zellen zeigten eine hohe Sensitivität gegenüber SDF-1 im gerichteten Plasmaclot (Abb. 83A) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 83B) sowie zur Chemotaxis im ungerichteten Clot (Abb. 83C und D). Desweiteren konnte auch in diesen Versuchen eine kollektive Zellbewegung in Richtung SDF-1-Reservoir beobachtet werden (Abb. 83A).

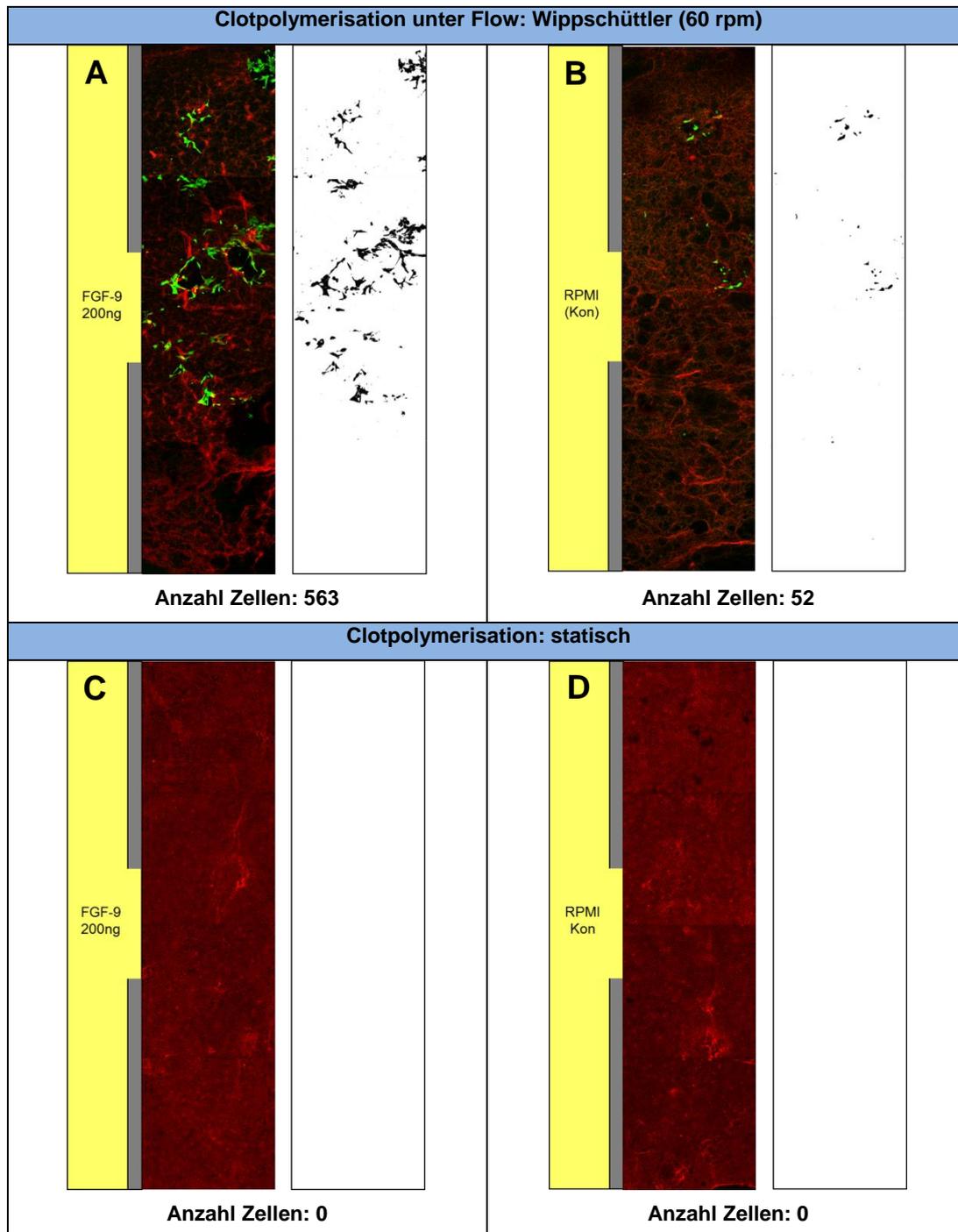


Abb. 82: Chemotaktische Antwort der H9-Zellen auf FGF-9 (50ng) im Migrationsmodell. A: in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) im Vergleich zu C: in einem ungerichteten Clot (Clotpolymerisation: statisch). B und D: dazu korrespondierende Negativkontrollen.

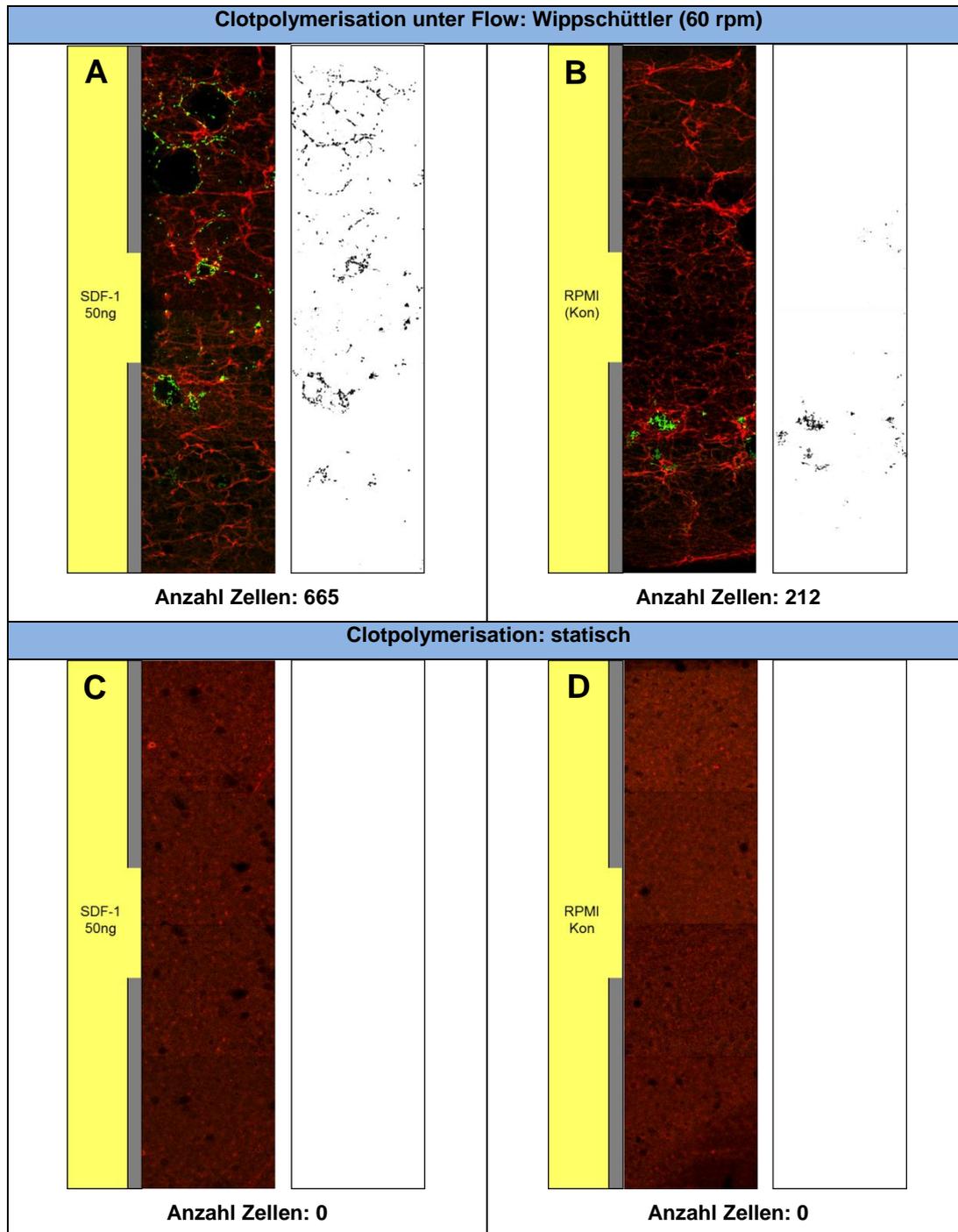


Abb. 83: Migration von H9-Zellen in Richtung SDF-1-Reservoir im Migrationsmodell. A: in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) im Vergleich zu C: in einem ungerichteten Clot (Clotpolymerisation: statisch). B und D: dazu korrespondierende Negativkontrollen.

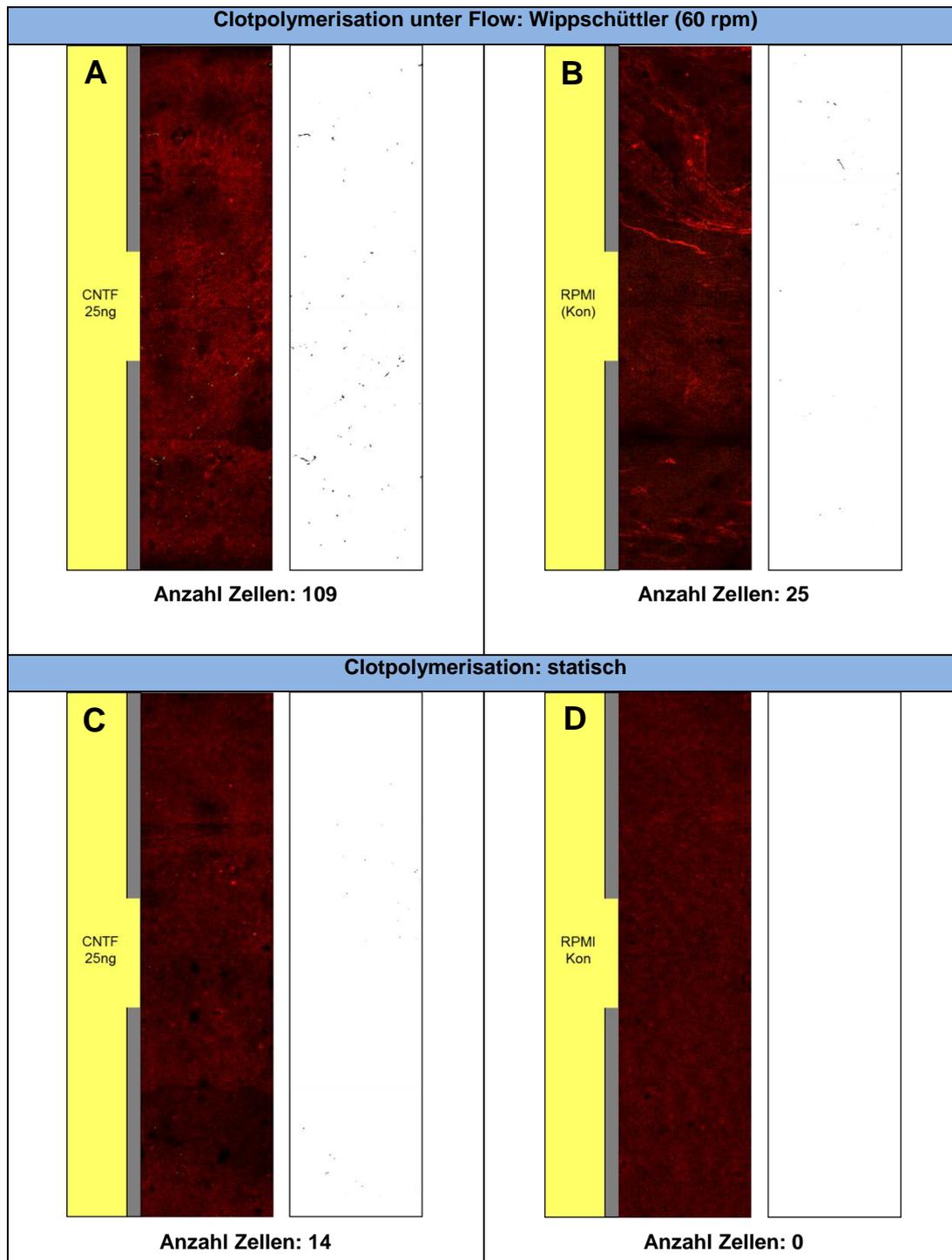


Abb. 84: Chemotaktische Antwort der H9-Zellen auf CNTF (25ng) im Migrationsmodell. A: in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) im Vergleich zu C: in einem ungerichteten Clot (Clotpolymerisation: statisch). B und D: dazu korrespondierende Negativkontrollen.

Wie in Abbildung 84A ersichtlich, zeigte CNTF im Vergleich zu den anderen untersuchten chemotaktischen Faktoren die geringste Wirkung auf die Zellmigration im gerichteten Plasmaclot.

Um Unterschiede im Migrationsverhalten der H9-Zellen im gerichteten und ungerichteten Clot zu detektieren, wurde für alle Chemotaxisversuche die Zellzahl berechnet und die Ergebnisse in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Anzahl der migrierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw. (n = 3 unabhängige Versuche).

	Clot-Polymerisation unter Flow (Wipp 60rpm)	Clot-Polymerisation statisch
Kontrolle	12 \pm 15	5 \pm 11
VEGF (200ng)	252 \pm 11	17 \pm 2
IGF-I (50ng)	197 \pm 5	74 \pm 19
PDGF-BB (100ng)	254 \pm 12	2 \pm 3
FGF-9 (200ng)	550 \pm 15	3 \pm 4
SDF-1 (50ng)	663 \pm 3	0 \pm 0
CNTF (25ng)	98 \pm 8	11 \pm 8

Beim Vergleich der migrierten Zellen nach Clotpolymerisation unter Flow konnten mittels 1-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche hoch signifikante Unterschiede zwischen fast allen Faktoren und der dazugehörigen Negativkontrolle sowie untereinander aufgezeigt werden (Tab. 23). Nicht signifikant war die Zellzahl nur zwischen VEGF und PDGF-BB.

Tab. 23: Analyse der Signifikanz ($p < 0,05$) mittels 1-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche.

Clot-Polymerisation unter Flow (Wipp 60rpm)							
	Kon	VEGF	IGF-I	PDGF-BB	FGF-9	SDF-1	CNTF
Kon		$p < 0,001$					
VEGF	$p < 0,001$		$p < 0,01$	ns	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
IGF-I	$p < 0,001$	$p < 0,01$		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
PDGF-BB	$p < 0,001$	ns	$p < 0,001$		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
FGF-9	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$		$p < 0,001$	$p < 0,001$
SDF-1	$p < 0,001$		$p < 0,001$				
CNTF	$p < 0,001$						

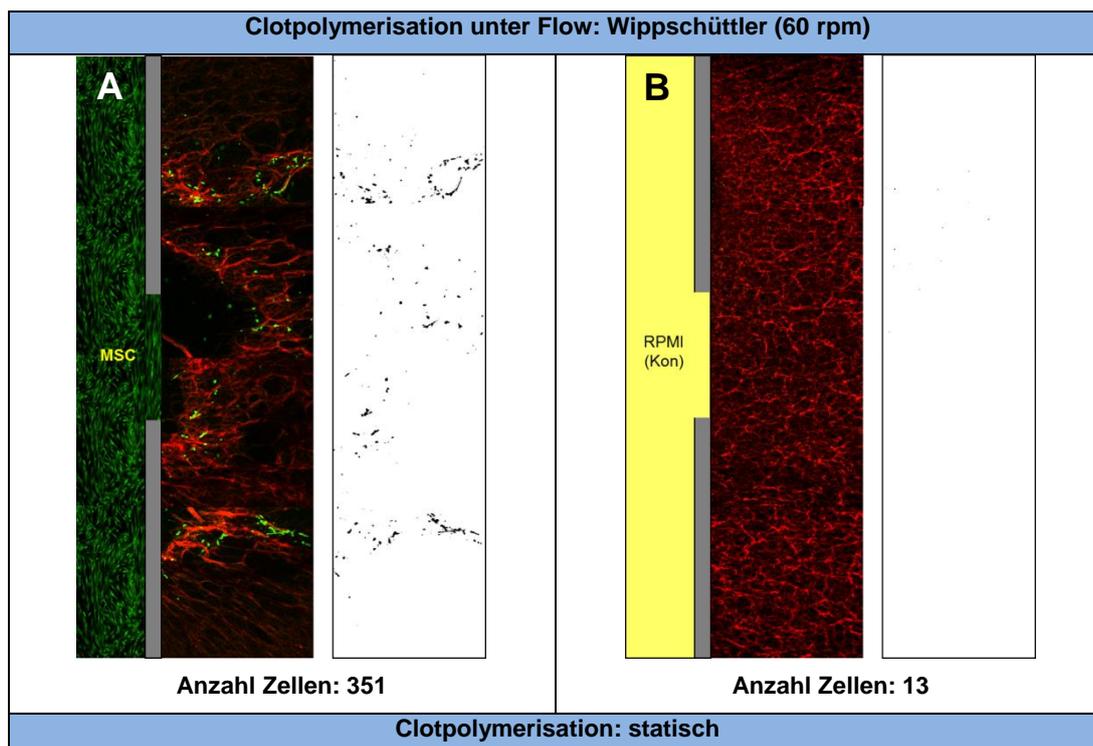
Zusätzlich wurde die Zellmigration über den Chemotaxis Index (CI) berechnet und die erhaltenen CI-Werte wurden mit den CI-Werten aus dem Transwell-System verglichen (Tab. 24). Die CI-Werte der Wachstumsfaktoren FGF-9 und SDF-1 zeigten in beiden Chemotaxis-Systemen die höchsten Werte. Die Korrelation nach Pearson zeigte einen deutlichen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0,01$ ($r = 0,9697$) zwischen Migrationsmodell und

Transwell-System. Insgesamt konnte bei den Chemotaxisexperimenten für VEGF, IGF-I, PDGF-BB, FGF-9 und SDF-1 im Migrationsmodell eine höhere Migrationsrate als beim Transwell-System beobachtet werden.

Tab. 24: Vergleich der Chemotaxis Indices (CI) von VEGF, IGF-I, PDGF-BB, FGF-9, SDF-1 und CNTF der beiden unterschiedlichen Chemotaxis-Systeme.

	Migrationsmodell	Transwell-System
VEGF (200ng)	20,0	10,2
IGF-I (50ng)	15,4	7,3
PDGF-BB (100ng)	20,2	9,9
FGF-9 (200ng)	44,8	23,8
SDF-1 (50ng)	54,2	35,8
CNTF (25ng)	7,2	7,4

Um die Zellmigration von H9-Zellen zu induzieren, wurden in weiteren Versuchen anstelle von rekombinanten Chemokinen MSC direkt als Chemokindonoren eingesetzt. Abbildung 85A zeigt, dass die H9-Zellen zielgerichtet im gerichteten Plasmaclot in Richtung MSCs im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 85B) sowie zur Chemotaxis im ungerichteten Clot (Abb. 85C und D) migrierten. Die H9-Zellen wurden hier durch lösliche Faktoren, die von den MSC in die unmittelbare Umgebung sezerniert wurden, angezogen.



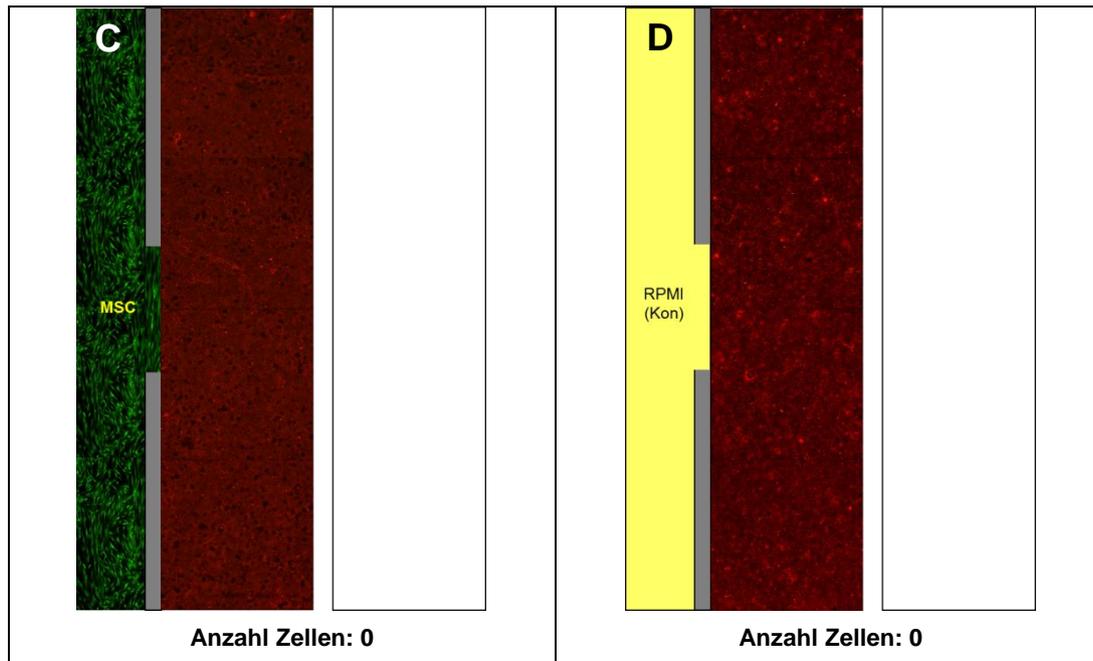


Abb. 85: Chemotaktische Migration von H9-Zellen, induziert durch MSC im Migrationsmodell. A: in einem gerichteten Plasmaclot (Clotpolymerisation unter Flow: Wippschüttler 60 rpm) im Vergleich zu C: in einem ungerichteten Clot (Clotpolymerisation: statisch). B und D: dazu korrespondierende Negativkontrollen.

Analysiert man die Ergebnisse beider Zelllinien in einer gerichteten Plasmaclot-Matrix, so lässt sich ein klarer Zusammenhang zwischen der Zellmigration und der Anwesenheit bzw. Abwesenheit einer chemotaktischen Substanz erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen in den Faktormessungen im Kollektiv gezielt in Richtung Chemokin-Reservoir bewegten. Die Zellmigration wurde nach einer vorher evaluierten Migrationszeit von 48h entlang des Acrylglas-Schiebers, der parallel zum Chemokin-Reservoir verläuft, analysiert. Während sich die Zellen bei fehlendem Gradienten ungezielt in alle Richtungen bewegten, konnte hingegen in Anwesenheit von chemotaktischen Substanzen eine signifikant höhere Zellzahl entlang des Acrylglas-Schiebers detektiert werden. Wichtige Voraussetzung bei der Beurteilung der Migration war allerdings, dass die Migrationsversuche immer gepaart im Vergleich von Kontrolle vs. Chemoattraktant ausgewertet wurden. Daraus ergibt sich, dass dieses entwickelte Auswertungsverfahren für die Analyse der Chemotaxis im Migrationsmodell geeignet ist. Das Deckglas am Boden der Migrationskammer ermöglichte zusätzlich eine hervorragende Visualisierung der Zellen mittels inverser Laser-Scanning-Mikroskopie.

Desweiteren dokumentieren die Ergebnisse, dass die gerichtete Clot-Matrix die gerichtete chemotaktische Zellmigration signifikant unterstützt. Sowohl MSC als auch H9-Zellen migrierten wesentlich schneller in Plasmaclots mit längs ausgerichteten Fibrinfasern,

während Clots mit ungerichteten Fasern die Zellmigration eher beeinträchtigen. Somit stellt nicht nur der chemotaktische aktive Faktor sondern auch die Ausrichtung der Matrix eine zentrale Voraussetzung für die Zellmigration dar.

Aussagen über die Zellgeschwindigkeit und die Migrationsverläufe der einzelnen Zellen konnten jedoch nicht gemacht werden, da dafür ein inverses Time-Lapse Fluoreszenz-mikroskopie-System erforderlich gewesen wäre. Das vorhandene Auflicht-Fluoreszenz-mikroskop mit motorisiertem Mikroskoptisch erwies sich leider für die Migrationsversuche als ungeeignet, da die Auswertung durch die opake Plasmaclot-Matrix hindurch und durch die Ränder der schmalen Migrationskammern erheblich erschwert wurde.

4.11.6 Zweikammersystem und Migrationsmodell im Vergleich

In dieser Studie begann die Chemotaxis-Analyse zunächst mit dem vereinfachten, zweidimensionalen Zweikammersystem und führte anschließend zu dem komplexeren dreidimensionalen Migrationsmodell.

Obgleich sich beide Chemotaxis-Systeme grundsätzlich voneinander unterscheiden, so konnten zumindest ihre Endergebnisse miteinander verglichen werden. Die Experimente mit beiden Zelllinien zeigten signifikante Unterschiede in der Zellmigration zwischen Faktormessungen und Negativkontrollen. Eine erhöhte Zellmigration in Richtung eines Gradienten konnten somit in beiden Systemen beobachtet werden. Die Ergebnisse des Chemotaxis-Assays mit dem Zweikammersystem gaben dabei einen ersten Überblick wie stark die ausgewählten Faktoren chemotaktisch auf MSC sowie H9-Zellen wirkten. Die effektivsten Faktoren wurden dann anschließend im Migrationsmodell eingesetzt.

Während sich die Ergebnisse des Zweikammersystems lediglich auf einen Wert (Zellzahl der Faktor- und Kontrollmessungen) beschränkte, konnten im Migrationsmodell mehrere Parameter herangezogen werden. Hier standen nicht nur die Sensitivität der Zellen gegenüber verschiedenen Konzentrationsgradienten im Vordergrund sondern auch die Analyse der Morphologie, des Zellbewegungsmusters und des Verhaltens der Zellen in einer gerichteten bzw. ungerichteten Clot-Matrix.

4.11.7 Bewertung der Chemotaxis-Versuche im Migrationsmodell

Das entwickelte 3D-Migrationsmodell bietet einen stabilen Gradienten während einer Inkubationszeit von 24h – 72h in einer Plasmaclot-Matrix und ermöglicht eine direkte Zellbeobachtung mit reproduzierbaren Chemotaxis-Ergebnissen. Obwohl sich die Grundbedingungen der Chemotaxisexperimente im Zweikammersystem und im Migrationsmodell voneinander unterscheiden, konnten in beiden Systemen signifikante Unterschiede zwischen Negativkontrollen und den gleichen effektivsten Faktoren gezeigt werden.

Hierbei wurde PDGF-BB als potentester chemotaktischer Faktor für MSC und SDF-1 für H9-Zellen in beiden Chemotaxis-Systemen identifiziert. Vergleicht man die beiden eingesetzten Zelllinien, erwiesen sich MSC insgesamt als motiler als H9-Zellen in einer gerichteten Clot-Matrix im Migrationsmodell.

4.12 Testung der optimierten Fibrinmatrices in klinisch einsetzbaren Nerven-Konduits

Derzeit gibt es eine Reihe kommerziell erhältlicher Nervenleitschienen, die für den klinischen Einsatz zugelassen sind. Bei der Entwicklung dieser klinisch zugelassenen Nervenleitschienen kam es zunächst darauf an, die Verbindung zwischen den durchtrennten Nervenenden wiederherzustellen. Zu diesem Zweck werden hohle Röhren aus verschiedensten biologisch abbaubaren Biomaterialien (z.B. Chitosan, Polycaprolacton, bovines Kollagen) hergestellt und sind herstellerspezifisch in verschiedenen Längen und Durchmessern erhältlich. Allerdings hat bisher keine dieser Leitschienen eine breite Akzeptanz in der klinischen Anwendung gefunden, da die erreichten Therapieergebnisse unbefriedigend waren. Mit der Ergänzung von intraluminalen Leitstrukturen in Form von längsorientierten Fibrinfasern sollte daher in dieser Studie eine erfolgreiche Nervenregeneration in diesen hohlen Leitschienen potentiell unterstützt werden.

Abschließend wurden hier die optimierten Fibrinmatrices in klinisch zugelassenen Chitosan-Konduits (Reaxon Nerve Guide) getestet.

Zunächst wurde alternativ für Vorversuche zur Überprüfung der Ausrichtungsmethoden ein Teflon-Schlauch mit identischen Maßen wie die Chitosan-Konduits verwendet. In diesen Experimenten konnte deutlich und reproduzierbar gezeigt werden, dass Fibrinfasern auch im Teflon-Schlauch unter Flow (Wippschüttler 80 rpm) ausgerichtet werden konnten (Abb. 86B und 86D). Während im Kontrollclot eingebettete MSC homogen und ungerichtet verteilt waren (Abb. 86C), wurde das longitudinale Richtungswachstum der Zellen durch die Längsorientierung der Fibrinfasern unterstützt (Abb. 86D).

Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem Chitosan-Konduit erzielt. Das hohle Chitosan-Konduit erwies sich als gute Grundlage zur Befüllung mit einer ausgerichteten Plasmaclot-Matrix. Abbildung 87 zeigt ein Konduit mit integriertem zellbesiedelten Plasmaclot nach gezielter Ausrichtung auf dem Wippschüttler (80 rpm).

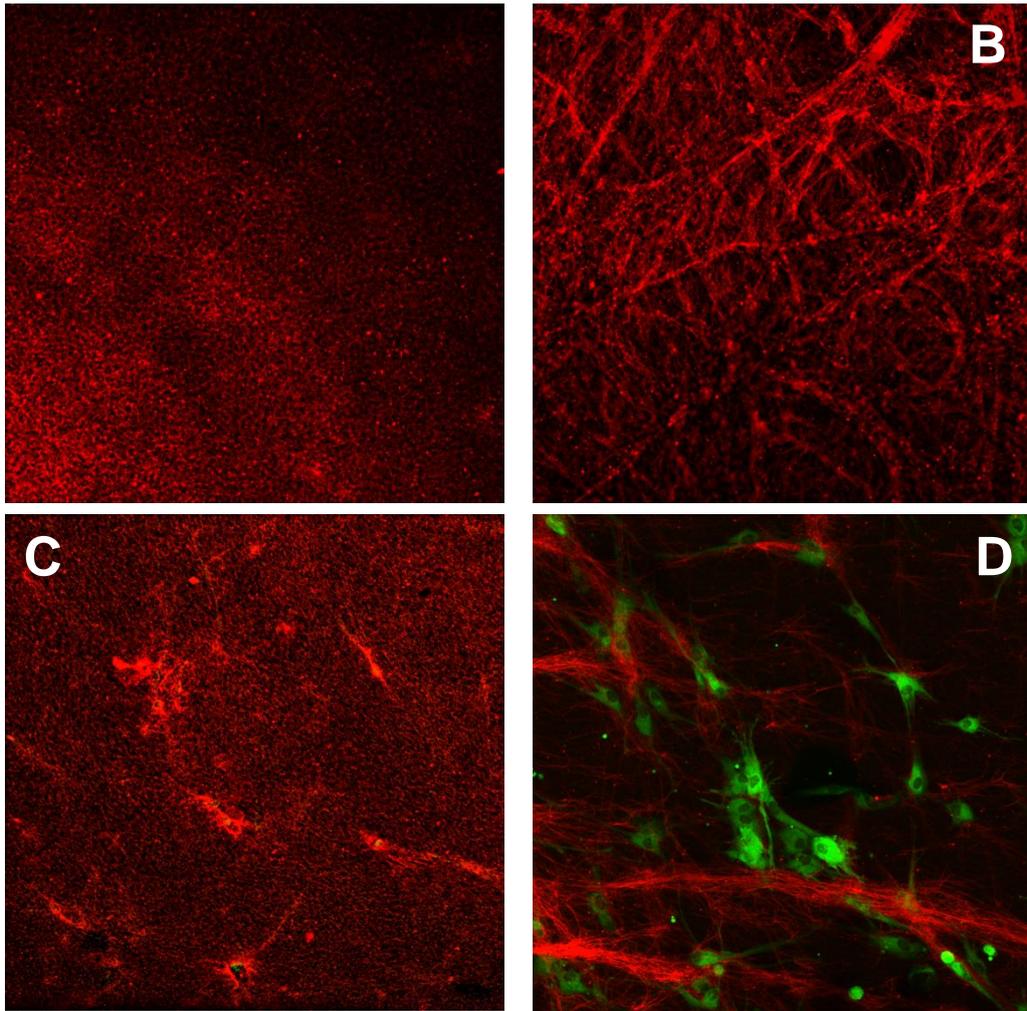


Abb. 86: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen von Plasmaclots nach Polymerisation im Teflon-Schlauch mit / ohne MSC unter folgenden verschiedenen Versuchsbedingungen:

A: statisch (Kontrolle, ohne weitere Manipulation) (Vergrößerung: x 10)

B: unter Flow-Bedingungen auf einem Wippschüttler 80 rpm (Vergrößerung: x 10)

C: statisch mit eingebetteten MSC (Vergrößerung: x 10)

D: unter Flow-Bedingungen auf einem Wippschüttler (80 rpm) mit eingebetteten MSC (Vergrößerung: x 10)

C –D: Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden die MSC mit Calcein-AM gefärbt (grün).



Abb. 87: Chitosan-Konduit Reaxon Nerve Guide (Medovent), gefüllt mit Cytopainter-gelabelten MSC, eingebettet in einem ausgerichteten Plasmaclot (Wippschüttler 80 rpm).

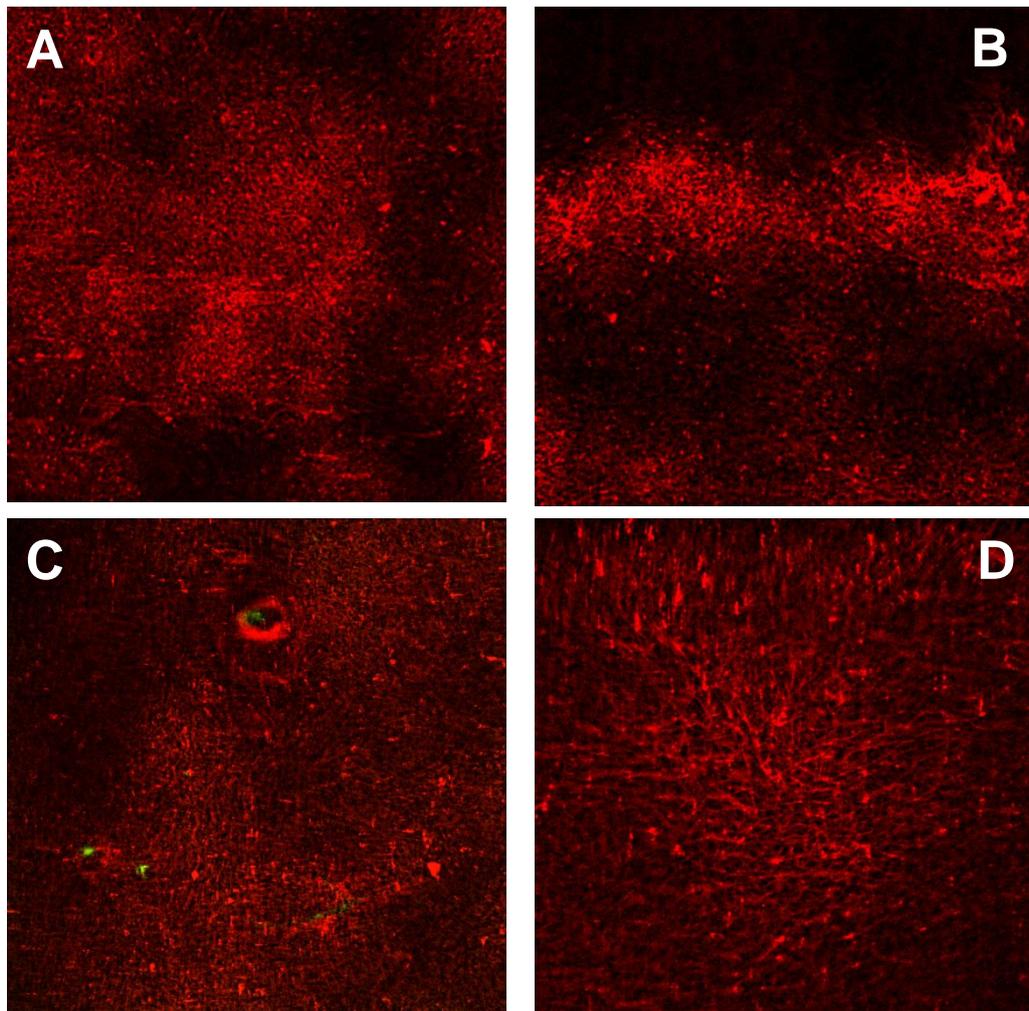


Abb. 87: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen von Plasmaclots nach Polymerisation im Chitosan-Konduit mit eingebetteten MSC unter Flow auf dem Wippschüttler (80 rpm).

A-C: Vergrößerung x10. D: Vergrößerung x20

Bei einer Fließgeschwindigkeit von 80 rpm auf dem Wippschüttler blieben die Clots im Konduit ungerichtet (Abb. 87). Da der Wippschüttler nicht höher eingestellt werden konnte, wurde ein weiterer Versuch auf dem Horizontalschüttler mit einer Horizontalbewegung von 120 rpm durchgeführt (Abb. 88). Eingebettet im Konduit ordneten sich hier die Fibrinfasern innerhalb der Clot-Matrix longitudinal aus (Abb. 88).

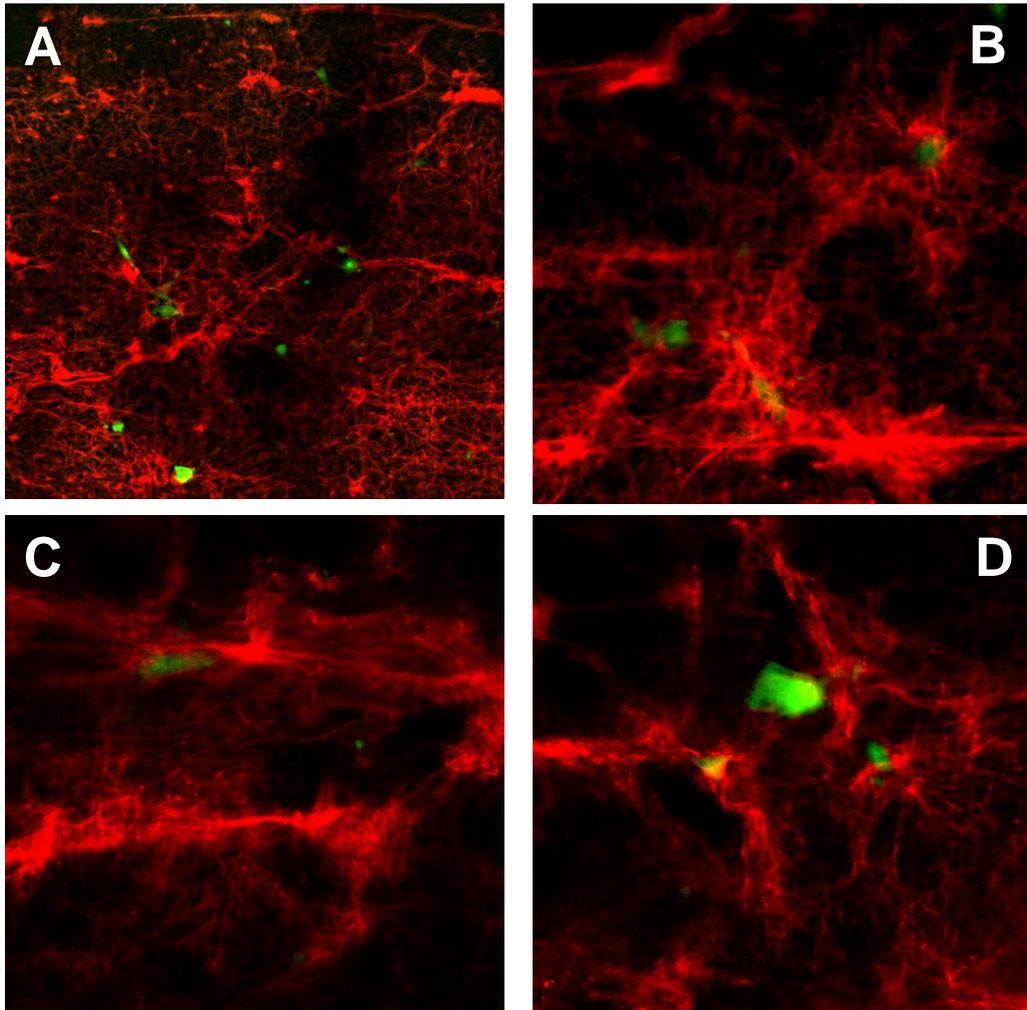


Abb. 88: Repräsentative Laser-Scanning-Aufnahmen von Plasmaclots nach Polymerisation im Chitosan-Konduit mit eingebetteten MSC unter Flow auf dem Horizontalschüttler (120 rpm).

A: Vergrößerung x10. **B-C:** Vergrößerung x20

Zusammengefasst haben die Ergebnisse gezeigt, dass das sehr einfach strukturierte Schienengerüst einer kommerziell erhältlichen Nervenleitschiene - wie das hier verwendete Chitosan-Konduit (Medovent) - durch Füllung mit einer autologen Plasmaclot-Matrix modifiziert werden kann.

Um ein offenesporiges Netzwerk longitudinal ausgerichteter Fibrinfasern im Konduit zu erhalten, erfolgte die Clotpolymerisation unter Flow auf dem Wipp- bzw. Horizontalschütter. Auf diese Weise wurde das Einbringen von einem ausgerichtetem Plasmaclot in das hohle Konduit erfolgreich getestet. Zusätzlich können wachstums- bzw. regenerationsfördernde Zellen wie MSC in die Clot-Matrix eingebracht werden. Neurotrophe Substanzen, wie VEGF 165, IGF-I, PDGF-BB, FGF-9, SDF-1, CNTF und NGF können ergänzend angewandt werden.

Literatur

Even-Ram, S.; Yamada, K.M.: Cell migration in 3D matrix. *Current Opinion in Cell Biology* 17: 524-532 (2005)

Foxman, E.F.; Kunkel, E.J.; Butcher, E.C.: Integration conflicting chemotactic signals. The role of memory in leukocyte navigation. *J Cell Biol* 147: 577-588 (1999)

Friedl, P.; Bröcker, E.-B.: The biology of cell locomotion within 3-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57: 41-64 (2000)

Küchler, A.: Hochspannungstechnik. 2. Auflage. Springer, ISBN 3-540-21411-9 (2005)

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

Für das Vorhaben relevante Ergebnisse, Veröffentlichungen und Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen liegen nicht vor.

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels

Die angestrebten Forschungsziele wurden im Projekt erreicht. Die hier vorgestellten Ergebnisse des Projektes 412.02-FR-219 sind für die DGUV in folgender Hinsicht relevant:

- Nach Abschluss des Forschungsvorhabens steht eine optimale längsgerichtete Matrix auf der Basis eines autologen Plasmaclots als innere Leitstruktur für kommerziell erhältliche, hohle Nervenleitschienen zur Verfügung.
- Durch die gute Biokompatibilität, die Biodegradation und die Bindung von Wachstumsfaktoren besitzt diese autologe Fibrinmatrix Vorteile gegenüber anderen

biologischen oder chemischen Polymermatrices, die Fremdkörperreaktionen hervorrufen können.

- Auch durch die Möglichkeit Plasma in dünne Nerven-Konduits zu injizieren und nachfolgend eine longitudinale Faserausrichtung zu erreichen, kann diese Plasma-Matrix für gerichtetes Nervenwachstum und auch zur Zelltherapie sehr geeignet werden.
- Die Nervenkonduittfüllung aus autologem Plasma mit simultaner Zellbesiedlung von patienteneigenen Stammzellen stellt einen weiteren erfolgsversprechenden Ansatz dar, um langfristig bessere klinische Resultate zu erzielen.

Schlussfolgerungen

Experimentell konnte gezeigt werden, dass neurale Stammzellen sowie mesenchymale Stammzellen sich neben dem Konzentrationsgefälle chemotaktischer Faktoren hauptsächlich an den Strukturen ihrer unmittelbaren Umgebung orientierten. Ein Plasmaclot mit longitudinal angeordneten Fibrinfasern erwies sich dabei als optimales Milieu für die spontane gerichtete Orientierung der Zellen. Im Gegensatz dazu, wurde in ungerichteten Clots (Polymerisation statisch) die Zellmigration durch die engen Poren behindert. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz einer geeigneten Füllmatrix für hohle Nerven-Konduits, wie hier longitudinal ausgerichtete Fibrinfasern, um ein gerichtetes Nervenwachstum zu garantieren. Die dreidimensionale Struktur einer autologen ausgerichteten Plasmaclot-Matrix ist also als temporäre Füllung hohler Nervenleitschienen für die Rekonstruktion kurzer Nervendefekte geeignet. Desweiteren bieten die longitudinal ausgerichteten Fibrinfasern eine effektive Matrix für die Migration von Zellen und unterstützen die Diffusion von Nährstoffen. Die guten Ergebnisse dieser experimentellen Studie demonstrieren, dass die Kombination eines hohlen Nerven-Konduits mit einer autologen gerichteten Plasmaclot-Matrix eine mögliche neue Methode zur Unterstützung der peripheren Nervenregeneration ist. Regenerierende Nervenfasern können in dieser Matrix hochgradig gerichtet durch ein Nerven-Konduit geleitet werden, um eine schnellere Verknüpfung geschädigter Nervenbahnen zu erreichen.

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Teilergebnisse des Vorhabens wurden bereits während der Projektlaufzeit publiziert und die Vorversuche bei unterschiedlichen Kongressen präsentiert:

Publikation:

Gessmann, J.; Seybold, D.; Peter, E.; Schildhauer, T.A., Köller, M.: Alignment of he fibrin network within an autologous plasma clot. Tissue Eng Part C Methods: 2015

Abstract der Vorversuche:

Gessmann, J.; Seybold, D.; Peter, E.; Schildhauer, T.A., Köller, M.: Etablierung einer longitudinalen Fibrin-Matrix aus autologem Plasma. DKOU 2012

Poster der Vorversuche:

Köller, M.; Seybold, D.; Jettkant, B.; Peter, E.; Schildhauer, T.A., Gessmann, J.: Alignment of fibrin fibers within an autologous plasma clot cell carrier matrix. ORS Annual Meeting 2013

Eine Publikation der erzielten Gesamt-Ergebnisse des Forschungsvorhabens ist nach Projektabschluss geplant.