

**Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. Christian Hagl

**Evaluation einer neuartigen Zellquelle im  
kardiovaskulären Tissue Engineering –  
Die Herz-Lungen-Maschine**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Hannah Sophie Schwender  
aus  
Gereonsweiler (Linnich)  
Jahr 2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Hagl  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Heindl  
PD Dr. Bruno Huber  
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Nikolaus Thierfelder  
Dipl.- Ing. Fabian König  
M. Sc. Maximilian Grab  
Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel  
Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2021

## I. Inhalt

### Inhalt

<b>I. INHALT .....</b>	<b>3</b>
<b>II. ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>III. KURZZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>9</b>
<b>V. EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
V.1    DIE HERZKLAPPEN.....	10
V.2    HERZKLAPPENERKRANKUNGEN .....	12
V.2.1 <i>Kongenitale Klappenvitien</i> .....	12
V.2.2 <i>Erworbene Klappenvitien</i> .....	13
V.2.3 <i>Herzklappenersatz und eingesetzte Prothesen</i> .....	14
V.3    TISSUE ENGINEERING VON HERZKLAPPEN .....	18
V.3.1 <i>Zellquellen und Klappengerüste</i> .....	19
V.3.2 <i>Klinische Studien</i> .....	22
V.3.3 <i>Wirkung von Scherspannung und Umsetzung im Tissue Engineering</i> .....	24
V.4    HINTERGRUND UND ZIEL DER ARBEIT .....	27
V.4.1 <i>Zirkulierende Endothelzellen und endotheliale Progenitorzellen</i> .....	27
V.4.2 <i>Die Herz-Lungen-Maschine als neuartige Zellquelle</i> .....	28
V.4.3 <i>Zielsetzung</i> .....	30
<b>VI. METHODEN .....</b>	<b>32</b>
VI.1    ZELLISOLIERUNG .....	32
VI.1.1 <i>Patientenkollektiv</i> .....	32
VI.1.2 <i>Zellgewinnung durch Dichtegradientenzentrifugation aus Blut und großporigem Filter</i> ..	32
VI.1.3 <i>Zellgewinnung aus feinporigem Filter</i> .....	36
VI.1.4 <i>Gewinnung der vaskulären EC und FB der Kontrollgruppe</i> .....	36
VI.2    ZELLKULTUR.....	37
VI.2.1 <i>Passagieren</i> .....	37
VI.2.2 <i>Kryokonservierung</i> .....	38
VI.2.3 <i>Auftauen der Zellen</i> .....	39
VI.2.4 <i>Zellzählung</i> .....	39
VI.3    EVALUATION DER ZELLEN .....	41
VI.3.1 <i>WST-Zellviabilitätsbestimmung</i> .....	41
VI.3.2 <i>Immunzytologie</i> .....	42
VI.3.3 <i>Immunfluoreszenz</i> .....	46
VI.4    ZELLKULTIVIERUNG UNTER FLUSS .....	48
VI.5    EVALUATION DER ZELLEN UNTER FLUSS .....	51

VI.5.1	<i>Immunfluoreszenz</i> .....	51
VI.5.2	<i>Proliferationsbestimmung durch Zellzählung mit ImageJ</i> .....	52
VI.5.3	<i>Quantifizierung der Zell-Zell-Kontakte mit ImageJ</i> .....	53
VI.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	54
<b>VII.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>55</b>
VII.1	PATIENTENKOHORTE .....	55
VII.2	ZELLKULTUR.....	56
VII.3	WST-VIABILITÄTSBESTIMMUNG .....	61
VII.4	IMMUNZYTOTOLOGIE .....	63
VII.5	IMMUNFLUORESZENZ .....	67
VII.6	KULTIVIERUNG UNTER FLUSS .....	68
<b>VIII.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>72</b>
<b>IX.</b>	<b>RESÜMEE UND AUSBLICK</b> .....	<b>78</b>
<b>X.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>79</b>
<b>XI.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>80</b>
<b>XII.</b>	<b>APPENDIX</b> .....	<b>89</b>
XII.1	MATERIAL, LÖSUNGEN UND GERÄTE .....	89
XII.2	DANKSAGUNG.....	92
XII.3	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	93

## II. Abstract

**Introduction** Increasing life expectancy leads to a rising number of degenerative heart valve diseases. In an advanced stage of the disease heart valve replacement ist the only curative therapy. Conventional heart valve prostheses are mechanical or biological. The main disadvantages of those prostheses are lack of growth potential, required anticoagulation in case of a mechanical valve or the limited durability of a biological valve. Tissue engineered heart valves consist of autologous fibroblasts (FB) and endothelial cells (EC). Ideally combining growth, self-regeneration and no immunological response. A postoperative cell isolation from heart-lung machines (HLM) was established in a previous work. This method was further optimized for a more profitable cell harvest. Additionally those cells were analyzed regarding their attributes and suitability for the engineering of autologous heart valve prosthesis and compared with vascular EC and FB as a control group.

**Methods** For cell isolation 20 dual-chamber reservoirs of HLM were used postoperatively. After rinsing the filters of the heart-lung machine in the blood of the reservoir a mononuclear cell fraction could be separated via density gradient centrifugation. The cell fraction was split and cultivated in either EC-GM (growth medium) or FB-GM. Additionally fine pored filters from the HLM were cut up and cultivated in FB-GM. Cultivated cells were analyzed for rate of proliferation via WST assay (after 24 h, 48 h and 72 h). Additionally cells were immunohistochemically examined for expression of EC markers (PECAM, vWF, VE-cadherin), FB markers (TE-7) as well as antibodies staining muscle tissue (SMC myosin, myosin heavy chain) and  $\alpha$ -actin as cytoskeletal marker. Furthermore stem cell markers CD 45, CD 73, CD 90 and CD 105 were analyzed by immunofluorescence. Ultimately 15 EC lines were cultivated while experiencing up to 20 dyn/cm<sup>2</sup> unidirectional shear stress for 24 h. For comparison those cell lines were stained by immunofluorescence for VE-cadherin and Sir-actin.

**Results** A total of 41 cell lines were obtained. 28 from cultivating the mononuclear cell fraction (15 cell lines cultured in EC-GM and 13 cell lines cultured in FB-GM) as well as 13 cell lines from cultivation of filters in FB-GM. Concluding in a successful cell isolation in 17 out of 20 reservoirs of HLM.

Measured via WST assay both cell types isolated from the HLM showed a higher proliferation than vascular EC and FB. By immunohistochemistry 23 cell lines showed expression of EC markers, 4 cell lines stained positive for FB markers and 14 cell lines

were positive for both type of markers. Stem cell staining was negative. EC cultured under shear stress showed a typical behavior. Alignment of the cells as well as the intracellular actin was observed to be in the direction of the flow. Additionally a higher proliferation rate and an increase of cell-cell contacts was shown.

**Summary** With a successfull cell isolation in 17 out of 20 reservoirs, the HLM proved to be a reliable source for cell harvesting. It was also shown that these cells were suitable for tissue engineered heart valves. In particular, those cells had a higher proliferation rate compared to cells from vascular origin thus having a smaller time span to serve the high number of cells needed for tissue engineered heart valves. The isolated EC were also able to adapt to external influences such as the shear stress in flow cultivation.

### III. Kurzzusammenfassung

**Einleitung** Als Konsequenz einer kontinuierlich weiter steigenden Lebenserwartung in Deutschland, stieg in den vergangenen Jahren die Prävalenz von erworbenen Klappenerkrankungen. Diese können im Endstadium nur durch einen Herzklappenersatz kurativ behandelt werden. Herkömmliche Herzklappenprothesen sind mechanischer oder biologischer Entität. Beim Einsatz mechanischer Herzklappen birgt die erforderliche Antikoagulation ein erhöhtes Blutungsrisiko. Biologische Herzklappen zeichnen sich leider durch eine beschränkte Haltbarkeit aus. Beide Herzklappenprothesen weisen ein fehlendes Wachstumspotenzial auf.

Tissue-engineerte Herzklappen bestehen aus autologen vitalen Fibroblasten (FB) und Endothelzellen (EC) und sind deshalb fähig zu wachsen, selbstregenerierend und es kommt nach der Implantation zu keiner Immunreaktion. In einer vorangehenden Arbeit konnte die Methodik der Zellgewinnung postoperativ aus Herz-Lungen-Maschinen erarbeitet werden. In dieser Doktorarbeit wird die erweiterte Evaluation jener Zellen und deren Eignung zur Verwendung bei der Herstellung von Herzklappen überprüft.

**Methoden** Zur Gewinnung der Zellen wurden postoperativ 20 Zweikammer-Reservoir der Herz-Lungen-Maschine für die Weiterverarbeitung verwendet. Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation konnte das im Reservoir verbliebene Blut und die Rückstände der Filter in die mononukleäre Zellfraktion separiert werden. Ein Anteil dieser Fraktion wurde mit EC-GM (Wachstumsmedium), der andere mit FB-GM kultiviert. Zudem wurden die feinporen Filter des Reservoirs in Rechtecke geschnitten und in Petrischalen mit FB-GM kultiviert.

Die gewonnenen Zellen wurden mittels WST-Assay nach 24h, 48h und 72h auf ihr Proliferationsverhalten untersucht. Bei der Immunhistochemie wurden die EC-Marker vWF, VE-Cadherin und PECAM; FB-Marker TE-7; Muskelmarker SMC-Myosin, Myosin heavy chain; Zytoskelettmarker  $\alpha$ -Actin sowie der Zellkernmarker DAPI verwendet. Die Stammzellmarker CD 45, CD 73, CD 90 und CD 105 wurden mittels Immunfluoreszenz untersucht. 15 EC-Linien wurden in einem Flussversuch über 24h unter steigender unidirekionaler Scherspannung bis  $20 \text{ dyn/cm}^2$  kultiviert und anschließend per Immunfluoreszenz auf VE-Cadherin,  $\alpha$ -Aktin und DAPI angefärbt.

**Ergebnisse** Aus der mononukleären Zellfraktion konnten insgesamt 28 Zelllinien gewonnen werden. Durch Kultivierung der Zellfraktion in EC-GM wurden 15 Zelllinien, in FB-GM 13 Zelllinien gewonnen. Aus den Filtern, welche in Petrischalen in FB-GM

kultiviert wurden, konnten 13 Zelllinien gewonnen werden. Zusammenfassend konnten so aus 17 von 20 HLM erfolgreich Zellen gewonnen werden.

Der WST-Assay zeigte eine signifikant höhere Wachstumskurve für Endothelzellen und Fibroblasten verglichen mit Kontrollproben vaskulär gewonnener EC und FB.

In der Immunzytologie färbten sich in 23 Zelllinien die Zellen mit EC-Markern, in 4 Zelllinien mit FB-Markern sowie in 14 Zelllinien mit beiden Markern, im Sinne einer Kokultur. Die Stammzellfärbung war negativ, kein Marker konnte nachgewiesen werden. Unter Fluss verhielten sich die EC charakteristisch: Es kam zur Ausrichtung der Zellen und des Aktins parallel zum Fluss, Zellproliferation und Zunahme der Zell-Zell-Kontakte.

**Zusammenfassung** Die Herz-Lungen-Maschinen stellten sich mit 17/20 erfolgreichen Isolationen als zuverlässige Quelle zur Gewinnung von Zellen dar. Ebenso konnte das Potenzial dieser Zellen zur Weiterverarbeitung im Tissue-Engineering von Herzklappen aufgezeigt werden. In der Proliferationsrate zeigten sich die Zellen denen vaskulären Ursprungs als überlegen. Die erhöhte Wachstumsrate ermöglicht die schnelle Kultivierung einer ausreichenden Zellzahl für die Besiedelung der TEHV. Zudem adaptierten sich die EC unter Fluss an die externen Einflüsse, wie es auch bei EC in vivo der Fall ist.

## IV. Abkürzungsverzeichnis

BSA.....	Bovines Serum Albumin
CD.....	Cluster of Differentiation
CEC.....	Circulating Endothelial Cells
CO <sub>2</sub> .....	Kohlenstoffdioxid
DAPI.....	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
DG.....	Dichtegradientenzentrifugation
EACTS.....	European Association for Cardio-Thoracic-Surgery
EC.....	Endothelzellen
EC <sub>DG</sub> .....	Zellen, welche durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und in EC-GM kultiviert wurden
EC-GM.....	Endothelzellwachstumsmedium
ECM.....	Extrazelluläre Matrix
EKZ.....	Extrakorporale Zirkulation
EPC.....	Endotheliale Progenitorzellen
ESC.....	European Society of Cardiology
FB.....	Fibroblasten
FB <sub>DG</sub> .....	Zellen, welche durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und in FB-GM kultiviert wurden
FB-GM.....	Fibroblastenwachstumsmedium
FB <sub>FP</sub> .....	Zellen, welche aus Filterpapieren gewonnen und in Petrischalen in FB-GM kultiviert wurden
FCS.....	Fatalen Kälberserum
HLM.....	Herz-Lungen-Maschine
HRP.....	Horseradisch Peroxidase
MHC.....	Major Histocompatibility Complex
MSC.....	Mesenchymale Stammzelle
PBS.....	Phosphate Buffered Saline
SMA.....	Smooth Muscle Actin
TAVI.....	Transcatheter Aortic Valve Implantation
TE.....	Tissue Engineering
TEHV .....	Tissue Engineered Heart Valve

## V. Einleitung

Das Herz ist das zentrale Organ zur Aufrechterhaltung des menschlichen Kreislaufs. Durch diese wesentliche Rolle können schon geringe Veränderungen, wie sie die Herzkloppenerkrankungen darstellen, enorme Auswirkungen auf die Gesundheit und Lebensqualität des Menschen haben [1].

Der Herzkloppenersatz kann bei fortgeschrittener Erkrankung lebensrettend sein. Tissue Engineering von Herzklopfen rückt zunehmend in den Vordergrund, da aktuell verwendete Herzkloppenprothesen entscheidende Nachteile mit sich bringen.

### V.1 Die Herzkloppen

Das menschliche Herz besitzt vier Herzkloppen. Sie definieren die Übergänge zwischen den Vorhöfen und den Kammern des Herzens (Atrioventrikularkloppen) sowie zwischen den Kammern und den Ausflusstrakten, also Aorta und Truncus pulmonalis. Durch Öffnen und Schließen der Herzkloppen wird ein unidirektonaler, pulsatiler Blutfluss in Lungen- und Körperkreislauf ermöglicht, der der Herzaktivität angepasst ist. Die Herzkloppen sind in der Ventilebene durch die Anuli fibrosae verankert, siehe Abbildung 1. [2]

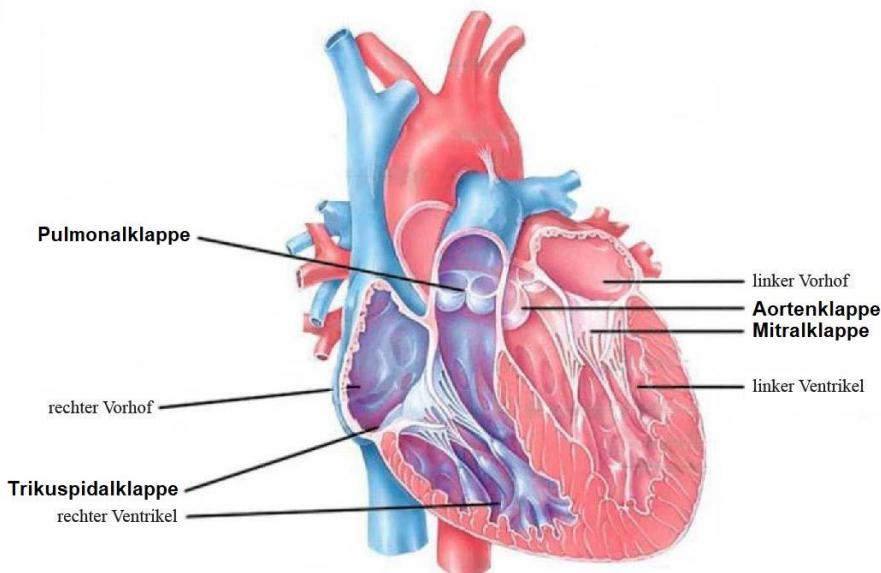


Abbildung 1: Schnitt durch das menschliche Herz. Darstellung der Taschenklappen: Pulmonal- und Aortenklappe sowie der Segelklappen: Trikuspidal- und Mitralklappe und Aortenklappe, modifiziert von [3].

Man unterscheidet zwischen zwei Segelklappen, welche zwischen Vorhof und Kammer gelegen sind und zwei Taschenklappen im Übergang zu den großen Gefäßen. Die Mitralklappe besitzt zwei, die Trikuspidalklappe drei Segel. Diese Segel sind mit den

Tendinae Chordae und Musculi papilares in der Herzmuskulatur der Kammern verankert. Die Segelklappen fungieren als Rückschlagventil. In der Diastole öffnen sich die Segelklappen und ermöglichen den unidirektionalen Blutfluss von den Vorhöfen in die Kammern. Während der Systole schließen sie sich durch den Druckaufbau in den Kammern und verhindern den Rückfluss des Blutes. Die zwei Taschenklappen, Aorten- und Pulmonalklappe, besitzen jeweils drei halbmondförmige Klappentaschen. Sie sind in der Systole geöffnet und in der Diastole geschlossen. [2]

Im Querschnitt sind die Segel der Herzkappen dünner als ein Millimeter dick. Der histologische Aufbau aller Herzkappen des Herzens ist gleich, siehe Abbildung 2. Als Teil des Endokards bestehen sie aus einer Basis aus Bindegewebe mit zwei Anteilen, der Fibrosa und der Spongiosa. Die Fibrosa ist reich an extrazellulärer Matrix und besteht hauptsächlich aus straffem Bindegewebe mit hohem Kollagen- und Elastinanteil. Die lockere Spongiosa welche durch Fibroblasten und Makrophagen gebildet wird ist reich an Hyaluron, Proteo- und Glykosaminoglykanen, welche für die Erreichung einer maximalen Zugfestigkeit in Richtung des Blutstroms ausgerichtet sind. Die bindegewebige Basis wird Richtung Lumen von einer endothelialen Schicht bedeckt. [4-7].

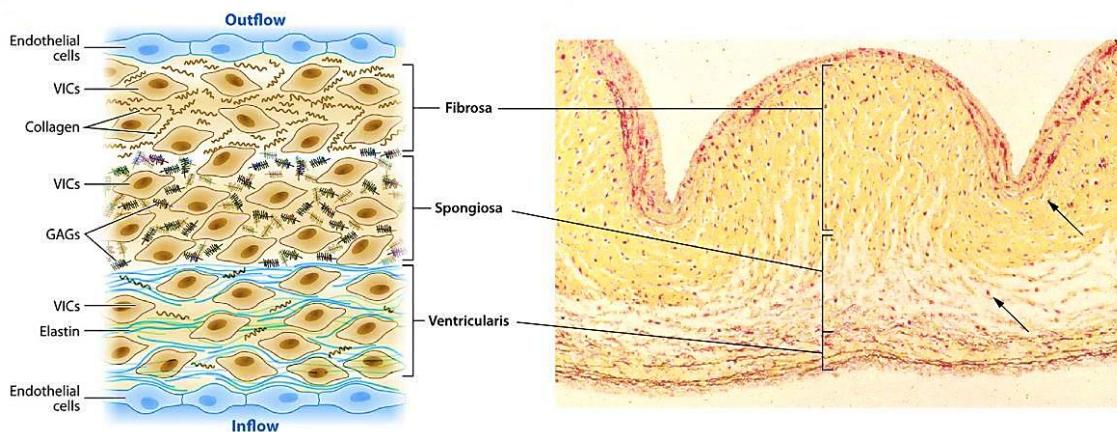


Abbildung 2: Histologischer Querschnitt durch ein Klappensegel. Die kollagenreiche Fibrosa, die Spongiosa mit den Glykosaminoglykanen (GAGs) und die elastinreiche Ventrikularis bilden die bindegewebige Basis der Herzkappe, Richtung luminal werden die interstitiellen Zellen (schwarze Pfeile: VIC, Fibroblasten) von einer konfluierenden Schicht Endothelzellen bedeckt, modifiziert von [8].

## **V.2 Herzklappenerkrankungen**

Herzklappenerkrankungen werden in angeborene und erworbene Erkrankungen unterteilt. Die erworbenen Herzklappenerkrankungen nehmen den weitaus größeren Anteil ein. [9]

Herzklappenerkrankungen treten in Form von Stenosen, Insuffizienzen oder deren Kombination auf. Als Folge der Herzklappendysfunktion wird dem Herzkreislauf unzureichend Blut zugeführt. Das Herz kompensiert mit Mehrarbeit. Stenosen führen durch die verengte Klappe zu einer verminderten Auswurfleistung und dadurch zu einem Aufstau des Blutes vor der Herzklappe. So kommt es zur Druckbelastung der vorgeschalteten Herzhöhle mit konzentrischer Hypertrophie des Myokards. Insuffizienzen resultieren durch einen unzureichenden Klappenverschluss in einem Pendelvolumen, welches durch Volumenbelastung zu exzentrischer Myokardhypertrophie führt. Klinisch können die Symptome einer Herzklappenerkrankung heterogen erscheinen. Im Anfangsstadium sind Klappenvitien häufig asymptomatisch, im Verlauf kommt es zu Symptomen wie Dyspnoe, Belastungsdyspnoe, Angina pectoris, Synkopen oder Leistungsschwäche. Auch Symptome im Sinne einer Einflussstauung wie Lungenödeme, Hepatomegalie, Aszites, Proteinurie oder Beinödeme sind möglich. Goldstandard der Diagnostik von Klappenerkrankungen ist die transösophageale Echokardiographie inklusive der Doppler-Messung. [10, 11]

### **V.2.1 Kongenitale Klappenvitien**

Kongenitale Defekte am Herzen finden sich bei 0,7-0,8 % aller Neugeborenen. Sie sind die häufigsten angeborenen Missbildungen. Häufig bleibt die Ursache kongenitaler Herzfehler ungeklärt. Ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Vitien kann durch Noxen, bestimmte Medikamente, Infektionen oder Alkohol im Schwangerschaftsverlauf oder durch genetische Syndrome bedingt sein. [12]

Neben den dominierenden Septumdefekten, welche etwa 50 % der kongenitalen Herzdefekte ausmachen, können auch alle vier Herzklappen von Missbildung betroffen sein. Die angeborenen Herzklappenfehler beinhalten den kompletten Verschluss, die Stenose und die Insuffizienz. Am häufigsten kommen Pulmonal- und Aortenklappenstenosen vor, welche je etwa 5 % aller kongenitalen Herzfehler ausmachen [13]. Trotz Verbesserungen der Diagnostik und Behandlung in den letzten Jahrzehnten können Vitien abhängig vom Typ und Ausprägungsgrad noch immer lebensbedrohlich

werden [14]. Deshalb ist bei 25 % aller Vitien eine Operation oder Katheterintervention innerhalb eines Jahres nach Geburt erforderlich. Im Jahr 2018 wurden über 80 % dieser pädiatrischen-herzchirurgischen Operationen bei kongenitalen Herzfehlern unter Anschluss an die extrakorporale Zirkulation (EKZ) durchgeführt. [15]

## V.2.2 Erworbene Klappenvitien

Häufiger als kongenitale Klappenvitien finden sich erworbene Erkrankungen der Herzklappen. Die Ätiologie der Herzklappenerkrankungen wird in zwei Gruppen unterteilt: die rheumatische und die degenerative Herzklappenerkrankung.

Die rheumatische Klappenerkrankung tritt als Folge von Streptokokkeninfektionen heute primär in Entwicklungs- und Schwellenländern auf. Eine Reaktion auf die grampositiven Streptokokken löst eine komplexe subakute autoimmune Entzündungsreaktion im Sinne eines molekularen Mimikrys gegenüber Myo- und Endokard aus [16, 17]. In der Folge kommt es zu Gewebezerstörung, Vernarbung, Degeneration, konsekutiver Kalzifikation sowie Verdickung der Herzklappensegel. Dies führt zu Klappenstenosen und/oder -insuffizienzen, siehe Abbildung 3. [18]

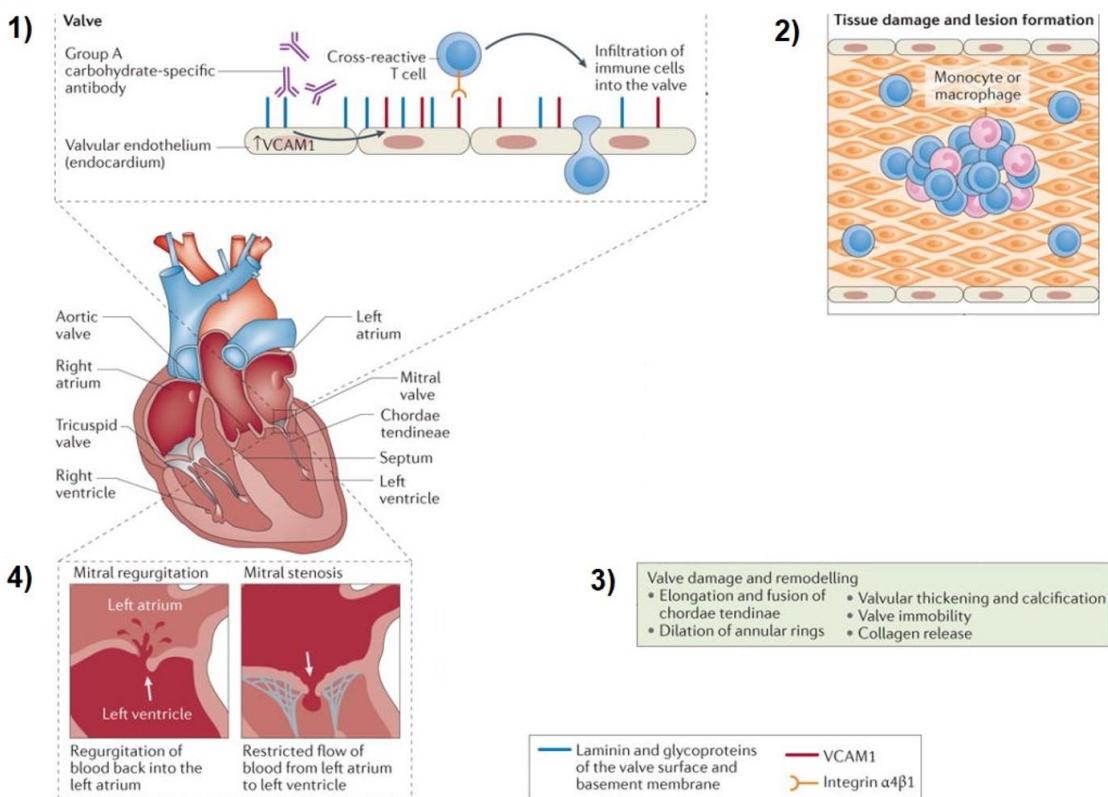


Abbildung 3: Pathophysiologie der rheumatischen Herzklappenerkrankung. 1) Systemische Immunreaktion auf Streptokokken, da valvuläres Endothel ein molekulares Mimikry darstellt; 2) Infiltration von Immunzellen (Monozyten, Makrophagen) in die Herzklappe, hierdurch kommt es zum 3) Remodeling mit Veränderung der Chordae tendinae, der Anuli fibrosi, einer Klappenverdickung, -kalzifizierung. 4) Konsekutive Mitralsuffizienz oder -stenose [18].

Häufig sind hiervon Kinder und junge Menschen betroffen. Dank verbesserter Primärprävention und Antibiotikaeinsatz ist diese Ätiologie der Klappenerkrankungen rückläufig. [19]

Im Gegensatz hierzu überwiegt in der westlichen Welt die primär-degenerative, nichtrheumatische Form der Klappenerkrankung. Analog zur Ätiologie der Arteriosklerose ist der degenerative Umbau der Herzklappen eine Folge kontinuierlicher Lipideinlagerungen, chronischer subakuter Entzündungen und konsekutiver Kalzifikationsprozesse. Die Aortenstenose ist, gefolgt von der Mitralsuffizienz, das häufigste erworbene Klappenvitium in Deutschland. Kombinierte Vitien sind häufig und können in einer Operation gemeinsam behandelt werden. [20, 21]

Die degenerative Herzklappenerkrankung ist eine Erkrankung des fortgeschrittenen Alters. Als Konsequenz einer kontinuierlich steigenden Lebenserwartung in Deutschland stieg in den vergangenen Jahren die Prävalenz von erworbenen Klappenerkrankungen. [22] Parallel stieg die Zahl der Operationen an Herzklappen im Jahr 2018 um 1,5 % im Vergleich zum Vorjahr [15].

### **V.2.3 Herzklappenersatz und eingesetzte Prothesen**

Da Herzklappen keinen suffizienten Selbstreparaturmechanismus besitzen, sind Interventionen zur Heilung der Herzklappenerkrankungen und für das Überleben der Patienten notwendig. 1956 wurde der erste autologe Herzklappenersatz einer biologischen Prothese durch Gordon Murray durchgeführt [23]. Seither hat sich der Herzklappenersatz zu einem Routineeingriff etabliert. Die Anzahl herzklappenassozierter Operationen ist kontinuierlich steigend und war in Deutschland im Jahr 2018 bei 34.951 Eingriffen, siehe Abbildung 4 [15, 24, 25]. Der Markt für prosthetische Herzklappen wurde 2018 weltweit auf 6,2 Milliarden USD geschätzt. Nach einer Schätzung des *market research future* könnte sich der Markt für Herzklappen bis 2025 mehr als verdoppeln. [26]

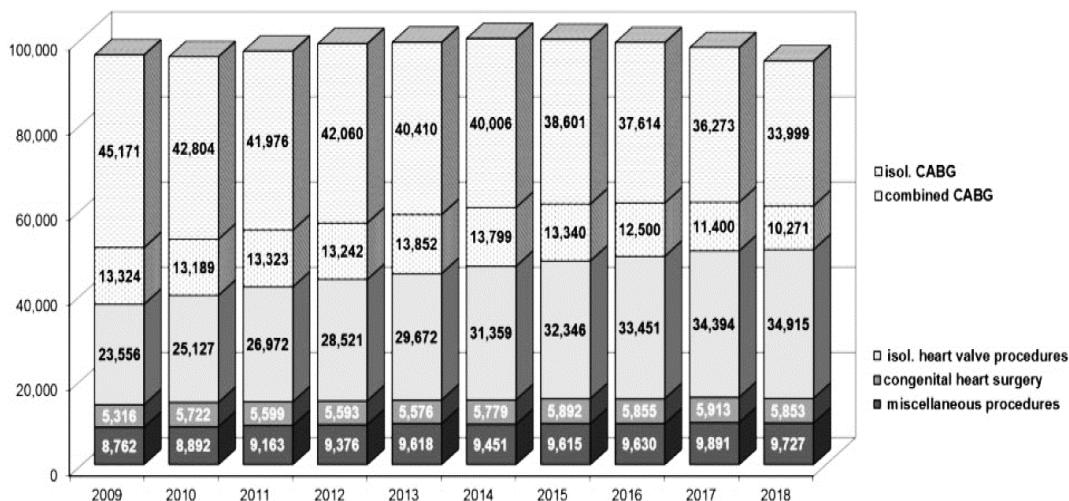


Abbildung 4: Anzahl herzchirurgischer Eingriffe 2009-2018 in Deutschland: Abnahme der Koronararterien-Bypass-Operationen (CABG), diskrete Zunahme der durchgeföhrten Herzklappenoperationen, konstante Anzahl der Operationen bei kongenitalen Herzdefekten, sonstige Operationen mit Anschluss an extrakorporale Zirkulation stagnierend (Miscellaneous procedures) [15].

Die Operationsindikation bei Klappenvitien wird, neben diagnostischen Parametern, primär anhand der Symptomatik und des Leidensdrucks des Patienten gestellt. Bei Symptombeginn beträgt die durchschnittliche Überlebensdauer bei Aortenstenose ohne Intervention noch etwa zwei bis drei Jahre. Neben klappenerhaltenden Eingriffen, wie der Ballondilatation, Kommissurotomie und unterschiedlichen Rekonstruktionen, wie beispielsweise der Ross-Prozedur, werden jährlich weltweit mehr als 300.000 biologische oder mechanische Klappen implantiert. Der Herzklappenersatz wird konventionell offen herzchirurgisch oder minimalinvasiv über einen Katheter durchgeführt. Am Beispiel der Aortenklappe kann der Zugang in Form der Transcatheter Aortic Valve Implantation (TAVI) transfemoral (Arteria femoralis, häufigster Zugangsweg), transaortal (Aorta), transsubclavial (Arteria subclavia) oder transapikal über die Herzspitze erfolgen. Durch diese Eingriffe kann eine signifikante Verbesserung von Überleben und Lebensqualität für die Patienten erreicht werden [27].

Die Wahl der Herzklappe ist abhängig vom Alter des Patienten und dessen Operationsrisiko. Zur Auswahl stehen mechanische und biologische Herzklappen (Abbildung 5). [28-31]

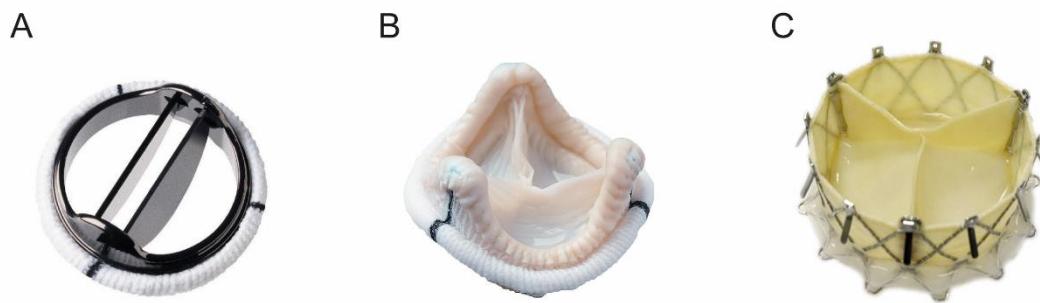


Abbildung 5: Herzklappenprothesen. A: Mechanische Klappenprothese. Zweiflügelprothese aus Pyrolitcarbon mit Nahtring aus Velour-Polyester; B: Biologische Klappenprothese in Stent aus Polyestermanschette; C: Biologische Klappenprothese in Stent (selbstexpandierend oder auf Ballon zur minimalinvasiven Implantation mittels TAVI) [32, 33]

Mechanische Herzklappenprothesen sind metallisch oder aus Pyrolitcarbon mit einem Nahring aus Polyester. Sie existieren als Kugel-, Scheiben- oder Zweiflügelprothesen. Am häufigsten werden mechanische Herzklappen in Form einer Doppelflügel-Prothese implantiert, siehe Abbildung 5 A. Sie zeichnen sich durch eine lange Haltbarkeit aus. Nachteilig ist das Risiko der Thrombogenität durch die Oberflächenstruktur der mechanischen Prothese, die veränderten Flussbedingungen sowie das erhöhte Risiko für Vorhofflimmern insbesondere in der Mitralkommissur, mit einer hohen Gefahr für Schlaganfälle. Deshalb erfordert die Implantation mechanischer Herzklappen eine lebenslange Antikoagulation, welche wiederum ein erhöhtes Blutungsrisiko mit sich bringt. [10, 34]

Biologische Klappen von Schweine- oder Rinderperikard in einem Polyester-Nahring sind durch ihre physiologische Oberflächenstruktur nicht thrombogen, siehe Abbildung 5 B, C. Sie werden antibiotisch behandelt und mit Glutaraldehyd fixiert, um ihre Immunogenität zu mindern. Durch diese Behandlung werden die Herzklappen jedoch steifer und mild toxisch, so dass eine Zellbesiedelung in vivo verhindert wird. Trotz Verbesserungen in den letzten Jahren ist die Haltbarkeit der biologischen Herzklappen durch Destruktion und Kalzifikationsprozesse gegenüber mechanischen Klappen deutlich eingeschränkt. [35]

Bezüglich des Überlebens und der Komplikationen wie Thromboembolien, Blutungsereignissen und Endokarditiden bieten beide Klappentypen sehr ähnliche Ergebnisse, mit einer leichten Überlegenheit der mechanischen Klappe [36]. Biologische Klappenprothesen bergen durch die begrenzte Haltbarkeit ein höheres Risiko für Re-Operationen [37, 38].

**Choice of the aortic/mitral prosthesis in favour of a mechanical prosthesis; the decision is based on the integration of several of the following factors**

Recommendations	Class <sup>a</sup>	Level <sup>b</sup>
A mechanical prosthesis is recommended according to the desire of the informed patient and if there are no contraindications to long-term anticoagulation. <sup>c</sup>	I	C
A mechanical prosthesis is recommended in patients at risk of accelerated structural valve deterioration. <sup>d</sup>	I	C
A mechanical prosthesis should be considered in patients already on anticoagulation because of a mechanical prosthesis in another valve position.	IIa	C
A mechanical prosthesis should be considered in patients <60 years of age for prostheses in the aortic position and <65 years of age for prostheses in the mitral position.*	IIa	C
A mechanical prosthesis should be considered in patients with a reasonable life expectancy <sup>f</sup> for whom future redo valve surgery would be at high risk.	IIa	C
A mechanical prosthesis may be considered in patients already on long-term anticoagulation due to the high risk for thromboembolism. <sup>g</sup>	IIIb	C

**Choice of the aortic/mitral prosthesis in favour of a bioprosthesis; the decision is based on the integration of several of the following factors**

Recommendations	Class <sup>a</sup>	Level <sup>b</sup>
A bioprosthesis is recommended according to the desire of the informed patient.	I	C
A bioprosthesis is recommended when good-quality anticoagulation is unlikely (compliance problems, not readily available) or contraindicated because of high bleeding risk (previous major bleed, comorbidities, unwillingness, compliance problems, lifestyle, occupation).	I	C
A bioprosthetic is recommended for reoperation for mechanical valve thrombosis despite good long-term anticoagulant control.	I	C
A bioprosthetic should be considered in patients for whom there is a low likelihood and/or a low operative risk of future redo valve surgery.	IIa	C
A bioprosthetic should be considered in young women contemplating pregnancy.	IIa	C
A bioprosthetic should be considered in patients >65 years of age for a prosthesis in the aortic position or >70 years of age in a mitral position or those with a life expectancy <sup>c</sup> lower than the presumed durability of the bioprosthetic. <sup>d</sup>	IIa	C

Abbildung 6: Leitlinien der ESC bezüglich Herzklappenerkrankungen. Empfehlungen zur Prothesenauswahl bei Aorten- oder Mitralklappenersatz. Class I: Wird empfohlen/ ist indiziert, Class IIa: Sollte berücksichtigt werden, Class IIb: Kann berücksichtigt werden, Level C: Handlungsempfehlungen von Expertengruppen [28]

Zusammenfassend muss die Wahl der Klappe bei jedem Patienten individuell abgewogen werden und kann unter Einbeziehung des aufgeklärten Patienten getroffen werden. Durch die European Society of Cardiology (ESC) wird in den Leitlinien für Aorten- und Mitralklappenersatz eine mechanische Klappe empfohlen, wenn keine Kontraindikationen für Antikoagulation vorliegen. Patienten über 65 Jahren kann für den Herzklappenersatz in Aortenposition, beziehungsweise Patienten über 70 Jahren in Mitralklappensposition eine biologische Klappe empfohlen werden, wenn die statistische Lebenserwartung nicht mehr die durchschnittliche Haltbarkeit der Klappe übersteigt, siehe Abbildung 6. Zusätzlich ist zu bedenken, dass die „Abnutzung“ der biologischen Klappe durch verminderte Aktivität im Alter minimiert ist [28, 39].

Aufgrund des zumeist hohen Alters der Patienten mit Herzklappenerkrankungen werden deutlich mehr biologische als mechanische Klappenprothesen implantiert, siehe Abbildung 7.

Prosthesis/native heart valve	Aortic			Mitral		
	N	†	%	N	†	%
Xenograft	8,800	312	3.5	1,813	184	10.1
Mechanical prosthesis	992	21	2.1	400	22	5.5
Repair	193	0	0.0	3,999	49	1.2
Homograft	37	1	2.7	10	1	10.0
Total	10,022	334	3.3	6,222	256	4.1

Abbildung 7: Anzahl der verwendeten Herzklappenprothesen beim Aorten- und Mitralklappenersatz im Jahr 2019 in Deutschland. Biologische Herzklappe als Xenograft, mechanische Prothese, Reparatur oder Homograft (menschlicher Spender). [15]

Bereits in den Leitlinien der ESC und der *European Association for Cardio-Thoracic Surgery* (EACTS) wird statuiert, dass es noch keine optimale Klappenprothese gibt [28]. Noch komplizierter gestaltet sich die Klappenwahl bei Kindern, Frauen mit Kinderwunsch und schwangeren Patientinnen. Für Säuglinge existieren keine ausreichend kleinen mechanischen Prothesen und je kleiner die Prothese, desto instabiler die Hämodynamik [40]. Zudem muss bei jenen Patienten die Indikation zur Antikoagulation äußerst eng gestellt werden, so dass trotz jungem Alter biologische Herzklappen implantiert werden müssen. Bei beschränkter Haltbarkeit der Bioklappen ist aber bei diesen Patienten nicht selten eine risikobehaftete Re-Operation notwendig. Leider muss auch eine mechanische Herzklappe im Verlauf aufgrund des fehlenden Wachstumspotenzials mittels Re-Operationen ersetzt werden. Generell ist der Behandlungserfolg bei Kindern nach Herzklappenersatz schlechter als bei Erwachsenen [41]. Ein Lösungsansatz in der pädiatrischen Herzchirurgie ist die Ross-Operation. Hierbei wird die Pulmonalklappe mit einem Homograft ersetzt und als Autograft an die Position der Aortenklappe implantiert [42]. Als vitales Gewebe ist die Herzklappe an der Aortenposition nun regenerations- und wachstumsfähig. Die Ross-Prozedur eignet sich jedoch nur für einen kleinen Anteil der Patienten, ist technisch anspruchsvoll, der Eingriff risikobehaftet und die Ergebnisse sind nicht einheitlich gut [43].

### V.3 Tissue Engineering von Herzklappen

Um die Nachteile der herkömmlichen Klappenprothesen zu umgehen, hat sich die Forschung zunehmend in Richtung des Tissue Engineering (TE) gewendet. Bereits 1993 beschrieben Langer et al. erstmals die Idee des TE als Lösungsansatz bei terminalem Zelluntergang und konsekutiver Organdysfunktion. Im TE werden, häufig durch ein interdisziplinäres Konzept, erkrankte Organe oder Gewebe durch im Labor produzierte Materialien ersetzt. Diese können azellulär implantiert werden oder es werden Zellen

isoliert, kultiviert und anschließend in oder auf einem Trägergerüst, dem Scaffold implantiert, siehe Abbildung 8. [44]

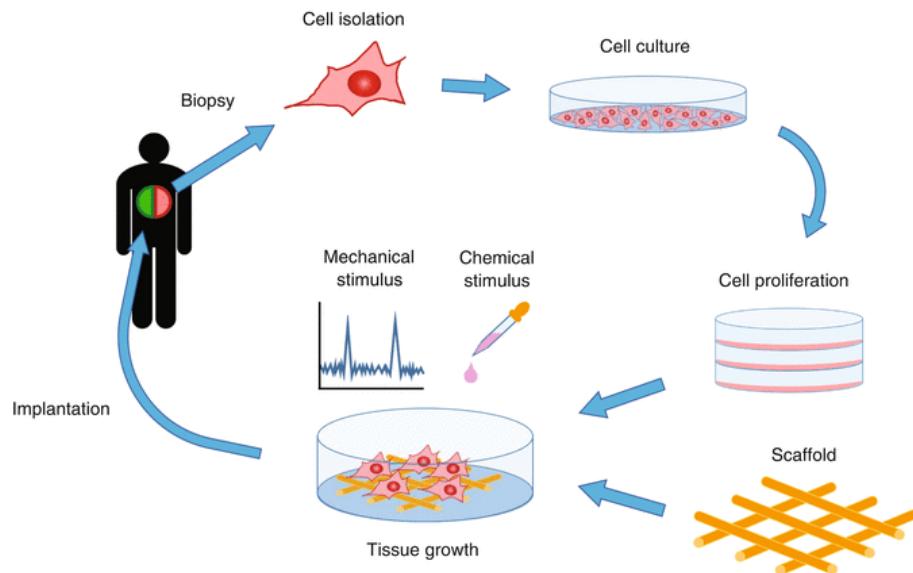


Abbildung 8: Möglicher Ablauf eines Tissue Engineering Prozesses. Das Konzept beginnt mit der Biopsie zur Zellisolation, gefolgt von der Zellkultivierung und -vermehrung, dem Aussähen der Zellen auf einem Scaffold und der Induktion durch mechanische oder chemische Reize, bis zur autologen Implantation. [45]

Die Anforderungen, die an eine optimale tissue engineerte Herzklappenprothese (TEHV, tissue engineered heart valve) gestellt werden sind eine langfristige Gewährleistung von Stabilität und Flexibilität sowie Resistenz gegenüber Kalzifikation und Destruktion. Außerdem sollte sie fähig sein zu Remodelling, Wachstum und Regeneration. Dies ist realisierbar durch ein Umfeld welches Zelladhäsion, -integration und -funktion ermöglicht. Zudem sollte die TEHV eine Antithrombogenität aufweisen und keine Immunantwort des Organismus auslösen. [46, 47]

### V.3.1 Zellquellen und Klappengerüste

Für eine funktionstüchtige TEHV sind in Anlehnung an eine physiologische Herzklappe mindestens zwei Zelltypen erforderlich, welche auf ein Klappengerüst ausgesät werden: Endothelzellen (EC) luminal und Fibroblasten (FB) basal. Je nach Ansatz kann die Zellauswahl jedoch variiert werden, siehe beispielsweise Abbildung 9.

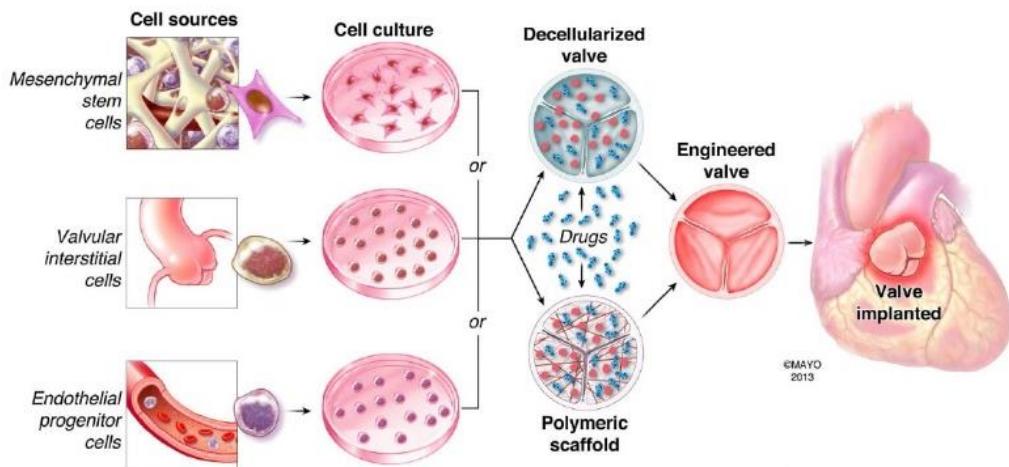


Abbildung 9: Darstellung verschiedener Ansätze im Tissue Engineering von Herzklappen. Der Prozess der TEHV Entstehung beginnt mit der Zellisolation aus unterschiedlichen Zellquellen, gefolgt von der Zellkultur, dem Aussähen der kultivierten Zellen auf einem Klappengerüst und der Implantation [48].

EC sind *in vivo* luminal der Scherspannung des Blutes ausgesetzt. Sie ermöglichen über unterschiedliche Mechanismen die Antithrombogenität der Herzklappe. Im TE konnte durch den Einsatz von EC eine reduzierte Entzündungsantwort *in vivo* und eine verminderte Thrombogenität der TEHV beobachtet werden. Gulbins et al. postulierten eine vitalere Proliferation von EC auf einer Schicht FB, im Gegensatz zu direkt auf dem Klappengerüst ausgesäten EC [49].

FB bilden *in vivo* die bindegewebsartige Basis der Herzklappen durch Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM). Sie erhalten die Elastizität der Herzklappe und erfüllen Reparatur- und Remodelingfunktionen. [30, 49-52]

Myofibroblasten sind die aktivierte Form der FB. Sie exprimieren Proteine wie beispielsweise  $\alpha$ -SMA (smooth-muscle-actin) und können sich so aktiv der Umgebung anpassen. Ein hoher Anteil an Myofibroblasten führt jedoch zu Versteifung und Retraktion der Klappe. Das richtige Verhältnis von Myofibroblasten zu FB ist deshalb für die Funktion der TEHV wichtig und kann *in vitro* angepasst werden. [53, 54]

Diese beiden Zelltypen konnten in zahlreichen Experimenten xenogen (andere Spezies, vom Tier), allogen/homolog (gleiche Spezies, vom Mensch) oder autolog (selbes Individuum) isoliert werden [55]. Sowohl EC als auch FB sind immunogen, können also von T-Zellen als köperfremd erkannt werden. Jedoch exprimieren nur EC MHC-Klasse-II-Proteinkomplexe (major histocompatibility complex) wodurch eine direkte Stimulation ruhender CD4 T-Zellen erreicht wird. Über diesen Weg findet eine

stärkere Abstossungsreaktion statt, weswegen bei EC der Einsatz von autologen Zellen besonders erstrebenswert ist. [56]

In vorangehenden Studien konnten multiple Quellen für die Isolierung von Zellen für TEHV erarbeitet werden. FB, Myofibroblasten oder alternative Zellen, welche ECM produzieren, wurden aus tierischen oder menschlichen Aortenklappen und -wurzeln, Gefäßen oder der Haut gewonnen. In Form von Stamm- beziehungsweise Vorläuferzellen gelang eine Isolation aus dem Knochenmark, dem Fettgewebe, dem Blut, der Nabelschnurmatrix oder dem Nabelschnurblut und aus dem Fruchtwasser. EC oder deren Vorläuferzellen wurden aus tierischen oder menschlichen Gefäßen, Aortenklappen, Fruchtwasser oder Nabelschnurblut isoliert, siehe Tabelle 1. [48]

Tabelle 1: Zelltypen, die zum Tissue Engineering von Herzklappen verwendet wurden und deren Herkunft [48]

Zelltyp	Zellquelle tierisch (Gewebe/Tier)	Referenz	Zellquelle menschlich (Gewebe)	Referenz
<b>Einsatz als Endothelzellen</b>				
<b>Valvuläre endotheliale Zelle</b>	Aortenklappe/Rind	[57]		
<b>Vaskuläre Endothelzelle</b>	A. carotis/Lamm	[58]	V. saphena magna	[59]
<b>Endotheliale Progenitorzelle</b>	Peripheres Blut/Schaf	[60]	Fruchtwasser, Nabelschnurblut, Peripheres Blut	[61-63]
<b>Knochenmarksprogenitorzelle</b>	Knochenmark/Lamm	[64]		
<b>Autologe Fruchtwasserzelle</b>	Fruchtwasser/Schaf	[65]		
<b>Einsatz als Fibroblasten</b>				
<b>Valvuläre interstitielle Zelle</b>	Aortenklappe/Schwein	[66]	Aortenklappe	[67]
<b>Vaskuläre Fibroblasten</b>	A. carotis/Lamm	[58]	V. saphena magna	[59]
<b>Mesenchymale Stammzelle</b>	Knochenmark/Schaf	[68]	Knochenmark, Fettgewebe, Nabelschnurmatrix, Nabelschnurblut, Fruchtwasser, Chorionzotten	[68, 69] [70] [71] [72] [73] [61]
<b>Induzierte pluripotente Stammzelle</b>			Haut	[74]
<b>Glatte Muskelzelle</b>	Aortenwurzel/Schwein	[75]		
<b>Myofibroblast</b>	Aortenwand/Schwein	[76]		

Direkt aus Herzklappen isolierte Zellen eignen sich am besten für das TE von Herzklappen. Ihre Verfügbarkeit ist jedoch begrenzt und valvuläre interstitielle Zellen fördern die Kalzifikation der Klappe [77]. Stammzellen zeichnen sich durch eine gute Verfügbarkeit und hohe Proliferationsrate aus, neigen jedoch ebenfalls, durch ihr

osteogenes Differenzierungspotential, zu vermehrter Kalzifikation [78]. Zudem besteht ein höheres Risiko zur Entartung und die ethischen Bedenken sind deutlich höher, als bei anderen Zelltypen [79].

Die Zellen werden beim TE dann *in vitro* auf einem dreidimensionalen Klappengerüst, dem Scaffold, ausgesät. Scaffolds verschiedener Materialien wurden in Studien untersucht. Unterschieden werden natürliche Klappengerüste von synthetisch hergestellten Scaffolds, siehe Abbildung 10. [80] Natürliche Herzklappen als Scaffolds sind allogener oder xenogener (meist Schwein oder Rind) Herkunft. Sie bieten eine optimale Geometrie und konsekutiv optimale Hämodynamik. [80] Zur Verhinderung einer Immunantwort können die Klappen fixiert oder dezellularisiert werden. Dabei wird die DNA des Spenders, optimalerweise unter Erhalt der ECM, entfernt [81]. Daneben existieren abbaubare Scaffolds aus synthetischem (PGA: poly-glycolic-acid; PLA: polylacticacid) oder biologischem Polymer (Gelatine, Kollagen, Fibrin) sowie nicht-abbaubare Polymerscaffolds aus Polyurethan [82]. Polymere sind potentiell geringer immunogen und sind jederzeit verfügbar, allerdings können Abbauprodukte proinflammatorisch wirken [83].

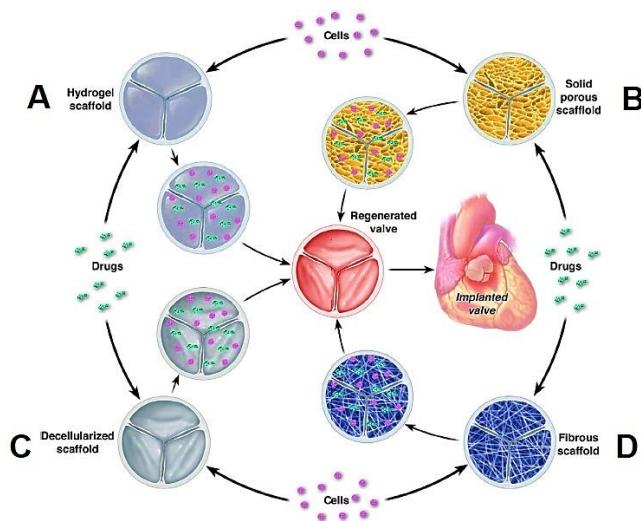


Abbildung 10: Im Tissue Enginnering von Herzklappen verwendete Scaffolds: A: Hydrogelscaffolds; B: poröse Scaffolds; C: dezellularisierte Klappengerüste; D: fibröse Scaffolds. Die Scaffolds werden optional mit Wirkstoffen (Drugs, grün) behandelt, mit Zellen (violett) besiedelt und in das menschliche Herz implantiert [80].

### V.3.2 Klinische Studien

Die erste präklinische Studie erfolgte 1995 durch Shinoka et al. sieben TEHV konnten erfolgreich in Lämmer implantiert werden. Dabei verwendeten sie autologe vaskuläre Zellen, die auf einem Polymerscaffold (PGA) ausgesät wurden. [84]

Es folgten Versuche mit verschiedenen Kombinationen von Zellquellen und Scaffolds sowie Implantationen in unterschiedliche Wirte wie Schafe, Schweine und Affen. Follow-ups bis zu 24 Wochen zeigten in den implantierten TEHV erfolgreiches ECM-Remodeling, ausgeprägte Repopulation durch Zellen des Wirtes und im Besonderen eine gute Endothelialisierung. Nicht zuletzt präsentierten die implantierten TEHV den natürlichen Klappen ähnelnde mechanische Eigenschaften sowie fehlende Hinweise auf Degeneration oder Kalzifikation. [30]

Neben diesen vielversprechenden Ergebnissen wurde jedoch eine Verdickung der Klappensegel beobachtet. Diese ist, wie bereits in vitro beobachtet auf eine überschießende ECM-Produktion zurückzuführen. In vivo führte diese Verdickung der Klappen zu Retraktion und konsekutiver Insuffizienz. [63, 85].

Die erste erfolgreiche Implantation einer TEHV in einen Menschen erfolgte im Jahr 2000 im Rahmen einer Operation nach Ross [86]. Bei einem 43-jährigen Patienten wurde die autologe Pulmonalklappe als Therapie seiner Aortenklappenstenose eingesetzt und an die Position der Pulmonalklappe ein Allograft implantiert. Dieses wurde dezellularisiert und mit autologen vaskulären Endothelzellen wieder besiedelt. Während eines 1-Jahres-Follow-Ups zeigte sich der Patient in gutem Allgemeinzustand und die TEHV wies in TTE, MRT und CT eine unveränderte Form und gute Funktion auf. 11 dezellularisierte Allografts wurden in den nächsten zwei Jahren nach dem gleichen Prinzip mit autologen Zellen besiedelt und als Pulmonalklappe implantiert. Auch nach 10 Jahren zeigten sich noch hervorragende hämodynamische Flussprofile und die Klappensegel ohne Hinweise auf Degeneration, Verdickung, Retraktion oder Kalzifizierung. [87]

Auch bei pädiatrischen Patienten kamen TEHV erfolgreich zum Einsatz. Es ließ sich ein den Patienten angepasstes Remodeling und Wachstum beobachten [88].

Tabelle 2: Studien zur Implantation von TEHV in den Menschen, Präkonditionierung im Bioreaktor in Wochen, Follow-up in Jahren [30].

Zellen	Präkondi- tionierung [Wochen]	Patienten -kohorte	Follow- up [Jahre]	Ergebnisse	Quelle
<b>Scaffold Allograft</b>					
<b>autologe vaskuläre EC</b>	4	1	1	exzellente Funktionalität	[86]
<b>autologe Progenitor- zellen (Blut)</b>	3	2	3	sicher und gut durchführbares Verfahren, gute Funktionsfähigkeit, bei leichter bis mäßiger Regurgitation	[88]
<b>autologe vaskuläre EC</b>	4	11	10	exzellente Hämodynamik, keine Zeichen der Degeneration oder Kalzifikation	[87]
<b>Scaffold Xenograft</b>					
<b>autologe vaskuläre EC</b>	4	12	5	gute Funktionsfähigkeit, keine Zeichen der Degeneration	[89]

### V.3.3 Wirkung von Scherspannung und Umsetzung im Tissue Engineering

Die Herzklappen sind hohen hämodynamischen Kräften ausgesetzt. Das Herzminutenvolumen passiert mit 4,5-5 l/min die Herzklappe. Dazu kommen etwa 40 Millionen Herzklappenbewegungen pro Jahr. Auf diese wechselnden Anforderungen reagieren Zellen und Herzklappengewebe durch kontinuierliche Neuerung und Umbau. Während die zyklische Scherspannung des Blutflusses im Bereich der Verankerung der Herzklappe vor allem die Zellproliferation anstößt, wird im Bereich der Klappensegel primär die Protein- und Glykosaminoglykansynthese angeregt. [90]

Im TE kommen Bioreaktoren zum Einsatz, in welchen zellbesiedelte Scaffolds vor Implantation konditioniert werden. Bioreaktoren imitieren möglichst physiologisch einen Blutfluss und unterstützen so die Zellproliferation und Gewebsformierung [91]. Im Sinne eines ersten Remodelings adaptieren sich die Zellen, unter Bildung der ECM, an die Scherspannung, der sie nach Implantation *in situ* ausgesetzt sein werden [59].

Angelehnt an das Gesetz von Hagen-Poiseuille ist die Berechnung der Scherspannung von der Viskosität des Blutes, der Flussrate und dem Radius der zirkulären Herzklappe oder des Gefäßes abhängig [92]. In der Praxis ist die Formel jedoch wenig zuverlässig, da sie für laminare Strömungen gilt wohingegen an Herzklappen unterschiedliche Strömungsarten existieren. Das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren ist physiologisch komplexer und die benötigten Parameter sind *in vivo* nicht konstant [93].

$$\tau = \frac{4 \eta Q}{R^3}$$

Formel 1: Berechnung des Scherspannung  $\tau$  [dyn/cm<sup>2</sup>]:  $\eta$ : dynamische Viskosität [dyn s/cm<sup>2</sup>];  $Q$ : Flussrate [ml/min];  $R$ : Radius [cm] [92].

Die Scherspannung kann *in vivo* stark variieren. An der Aortenklappe wurden Maximalwerte von 70 dyn/cm<sup>2</sup> bei einem Durchschnitt von etwa 23 dyn/cm<sup>2</sup> gemessen [94, 95]. EC reagieren auf die Scherspannung über mechanotransduktionsche Mechanismen auf biophysischer, biochemischer und genregulatorischer Ebene. Die sensorische Reizaufnahme erfolgt über zahlreiche Mechanismen, unter anderem über Adhäsionsmoleküle oder Zytoskelettveränderungen. [96]

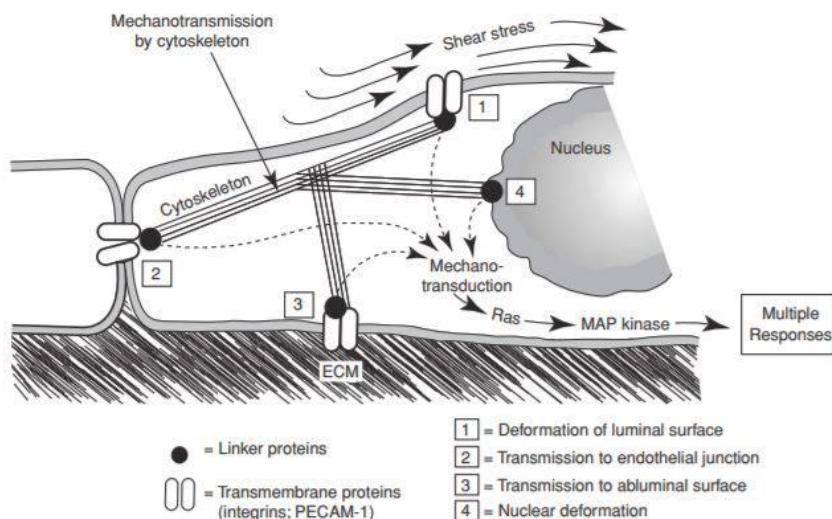


Abbildung 11: Auswirkung von Scherspannung auf eine EC 1) Mechanotransmission an der luminalen Seite der Zelle durch Deformierung der Glykokalyx, welche an Membranproteine und -lipide bindet. Als Reaktion werden Ionenkanäle aktiviert oder Signalwege über Caveolae initiiert. 2) Signaldetektion über Transmembranproteine an Zell-Zell-Verbindungen. Bei zunehmender Scherspannung werden hier beispielsweise vermehrt VE-Cadherin und PECAM in die Zellmembran integriert. 3) Transmission an der basalen Zellseite über Adhäsionsmoleküle, welche an die ECM binden. Eine Verstärkung des Zytoskeletts und Ausrichtung von Aktin parallel zum Scherstress wird über einen komplexen Signalweg gesteuert. 4) Mechanotransduktion durch Zellkernverformung. [96]

Unter Scherspannung ändern die EC ihre Form, Ausrichtung und Verankerung im Zellverband, ihre Stabilität, den Aufbau des Zytoskeletts sowie ihre metabolische Aktivität und Proliferationsrate. Selbst die Zelldifferenzierung kann angeregt werden. [97] Diese Vorgänge sind abhängig von der Zeit, die die Zelle der Scherspannung ausgesetzt wird, siehe Tabelle 3. Auch die tieferliegenden valvulären interstitiellen Zellen (FB) passen sich der Scherspannung und dem resultierenden Druck und Zug der

Gefäßwand an. Sie richten sich neu aus, werden steifer und passen die Exprimierung spezifischer Gene an. Beispielsweise wird die Biosynthese der ECM vermehrt angeregt. [98]

Tabelle 3: Beobachtete Effekte der Scherspannung. Auftreten wurde nach definierter Antwortzeit beobachtet. Nach zeitlicher Abfolge sortiert. Abhängig von der untersuchten Strömung (laminar oder turbulent) und der Höhe der untersuchten Scherspannung [97]

Antwortzeit [h]	Beobachteter Effekt	Strömung, Scherspannung [dyn/ cm <sup>2</sup> ]
Minuten	Gerichteter Umbau fokaler Adhäsionen	laminar, 10
< 1	Zugspannung kontrolliert Zellform und -wachstum über Extrazellulärmatrix-Integrin-Bindung	laminar
2	Hochregulation von ICAM-1 m-RNA und Protein	laminar, 2,5- 46
> 3	Zellproliferation, bis inaktiver Monolayer entsteht	turbulent, 1,5- 15
> 6	Zellausrichtung in der Flussrichtung; Funktion der Zeit und Stärke der Scherspannung, um Zug an Zellen zu minimieren	laminar, > 5
> 6	F-Aktin Zytoskelett und Fibronektin Neuanordnung parallel zu Zellausrichtung	laminar, > 5
12	Punktuelle Zellzyklusstimulation zur Erhaltung des konfluenten Monolayers	turbulent, 0- 10
> 24	Hemmung der Zellteilung	laminar

## **V.4 Hintergrund und Ziel der Arbeit**

In bisherigen Forschungen des TE von Herzklappen konnte noch keine optimale Kombination aus Zellen, deren Quellen und Trägersubstanzen definiert werden [99]. Auf der Suche nach besser geeigneten Zellen für das TE wird deshalb in der folgenden Arbeit eine neuartige alternative Zellquelle evaluiert.

In vorangegangenen Versuchen wurde die Isolationsmethodik dieser Zellquelle erarbeitet, welche durch Anpassungen im Rahmen der Arbeit weiterentwickelt wurde [100]. Die Zellen wurden nach offen herzchirurgischen Operationen aus der Herz-Lungen-Maschine (HLM) isoliert und kultiviert. Die Methodik beruht auf der Annahme, dass EC im Blut zirkulieren und intraoperativ in die Filter der HLM gelangen. Zudem gelangen durch die Operation gelöste Gewebeteile und FB durch den Sauger in die Filter des Kardiotomiereservoirs.

### **V.4.1 Zirkulierende Endothelzellen und endotheliale Progenitorzellen**

In den frühen 70er Jahren wurden durch Bouvier et al. erstmals zirkulierende EC (CEC, circulating endothelial cells) im peripheren Blut beschrieben. Physiologisch sind zirkulierende EC bei einem gesunden Menschen mit 0-12 Zellen/ml Blut sehr seltene Blutzellen. Im steigenden Alter kommt es zum physiologischen Abfall der CEC-Werte. Zirkulierende EC beschreiben sowohl reife, vom Endothel abgelöste EC wie auch endotheliale Progenitorzellen (EPC, endothelial progenitor cells) aus dem Knochenmark [101-104].

Zu Veränderungen der Konzentration der CEC im peripheren Blut kommt es durch vermehrtes Ablösen einzelner Endothelzellen oder Zellverbänden aus dem Endothel der Gefäße. Verschiedene Stimuli wie beispielsweise pro-inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Krankheitserreger, Lipoproteine oder oxydativer Stress triggern diesen Ablöseprozess. Die gelösten Zellen gehen entweder durch Apoptose zugrunde oder zirkulieren weiter als vitale Zellen im peripheren Blut. [105]

Höhere CEC-Werte im Blut sind also meist als Marker der endothelialen Schädigung zu werten. Sie steigen insbesondere bei kardiovaskulären Erkrankungen und bei systemischen Entzündungsreaktionen, vor allem bei Vaskulitiden, der Sepsis und in Stresssituationen, wie Transplantationen, Krebserkrankungen und als Reaktion auf bestimmte Medikamente an. [103]

Tabelle 4: Beispielhafte Einflüsse auf die Anzahl von CEC im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen der Studie [103]

Pathologie	CEC [Zellzahl/ml]	CEC- Kontrollgruppe [Zellzahl/ml]	Referenz
Akuter Myokardinfarkt	7,5	0	[106]
Angioplastie bei stabiler koronarer Herzerkrankung	15,9	-	[107]
Vorhofflimmern mit Schlaganfall/	15/	4,5	[108]
Linksherzversagen/Myokardinfarkt	10/9		
Schlaganfall	15,5	2,7	[109]
Typ II Diabetes mellitus	69	10	[110]
Septischer Schock	16,1	1,9	[111]

Scheubel et. al. beschreiben einen signifikanten Anstieg nach kardiovaskulären Bypass Operationen [104]. Die Größe kardiovaskulärer Eingriffe korreliert direkt mit dem Anstieg der CEC im Blut. So sind nach konventionell offenchirurgischem Klappenersatz signifikant höhere CEC-Werte zu beobachten als bei minimalinvasivem Aortenklappenersatz per TAVI [112].

Auch kommt es bei Stress oder Endothelschädigung zu einer vermehrten Ausschwemmung von endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark. So wurde ein Anstieg der EPC postoperativ und nach Trauma beobachtet [113].

#### V.4.2 Die Herz-Lungen-Maschine als neuartige Zellquelle

Seit ihrer Entwicklung durch John H. Gibbon und ihrem ersten Einsatz im Jahre 1953 ist die HLM ein fester Bestandteil vieler herzchirurgischer Eingriffe [114]. Bei zahlreichen Operationen, die am Herzen durchgeführt werden, wird das Herz durch eine kardioplegische Lösung in einen künstlichen Herzstillstand versetzt. Der Kreislauf, Blutdruck sowie die Ventilation des Blutes wird durch die HLM aufrechterhalten. Das venöse Blut wird mit Sauerstoff angereichert, es wird temperiert, Luftblasen und makroskopische Partikel werden ausgefiltert und anschließend dem Körper wieder zugeführt. [115]

Passiv durch die Wirkung der Schwerkraft oder aktiv durch einen induzierten Sog wird das venöse Blut aus dem rechten Vorhof oder den Venae cavae superior und inferior drainiert. In der venösen Sektion der HLM läuft das Blut durch einen zweiblättrigen feinporigen Filter (Porengrößen 41 µm und 120 µm). Bei den in der folgenden Arbeit verwendeten Reservoiren handelt es sich um Zweikammer-Reservoir, die neben der venösen Sektion ein Kardiotomiereservoir besitzen. In dem Kardiotomiereservoir wird

Blut, das von Saugern aus dem Operationsgebiet aspiriert wird, zur Autotransfusion gesammelt. Ein Polyurethanschwamm und ein gefalteter Filter (Porengröße 41 µm) säubern das Blut von Zellen und Geweberesten. Über einen grobporigen Schaumstofffilter wird das Blut in die venöse Sektion geleitet. Von hier pumpt eine Zentrifugal- oder Rollererpumpe das Blut in den Oxygenator, der die Gasaustauschfunktion der Lunge ersetzt. Dem Blut wird Sauerstoff zugeführt und Kohlenstoffdioxid entzogen. Über die arterielle Kanüle wird das Blut dem Patienten in der Aorta ascendens wieder zugeführt. [115]

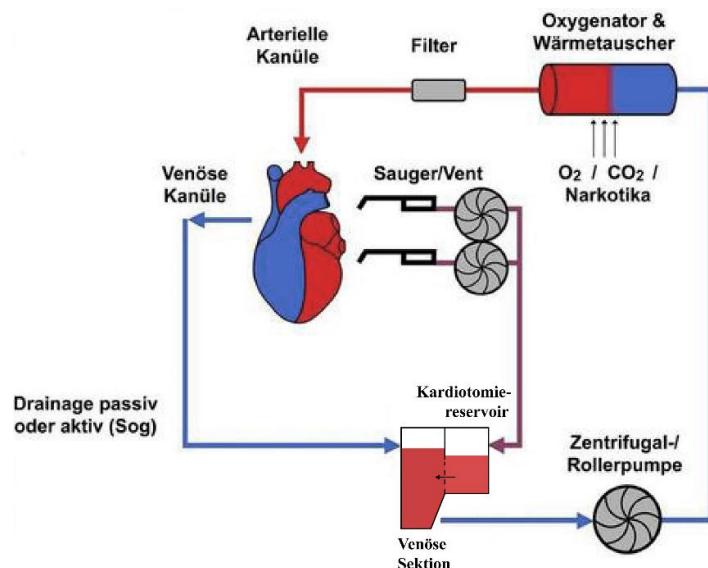


Abbildung 12: Aufbau der Herz-Lungen-Maschine. Über die venöse Kanüle wird das Blut dem Körper entzogen und in das Reservoir geleitet, hier wird es gemeinsam mit dem Blut aus den Saugern gesammelt und durch verschiedene Filter gereinigt. Über den Oxygenator wird das Blut zurück in das arterielle System des Patienten geleitet [116].

Für den Versuchsaufbau wurde angenommen, dass die gesuchten EC und FB sich sowohl im Blut als auch in den Filtern der Reservoirs der HLM befinden.

Wir erwarten aus mehreren Gründen eine erhöhte Zahl an CEC bei unseren Versuchspersonen: Nicht nur die Operation kann als Stressreiz Grund für einen CEC Anstieg sein. Vergleicht man Patienten die eine gleiche Operation mit und ohne Verwendung einer HLM durchmachen, so konnten bei Verwendung einer HLM postoperativ signifikant höhere CEC-Werte beobachtet werden. Dies erklärt man sich durch eine ausgeprägtere systemische Reaktion und konsekutiv größere Organschäden [117]. Der CEC-Wert ist nach HLM Einsatz nach 6-12h maximal und fällt dann wieder ab [118].

Vor wenigen Jahren wurde erstmals die Isolierung von Zellen aus Blut der extrakorporalen Zirkulation beschrieben. Die Arbeitsgruppe von Hoesli et al. beschrieb die Kultivierung von EPC bei Zellisolation aus der ECMO bei intensivpflichtigen Kindern. Nebenbefindlich fielen hierbei Kolonien von mesenchymalen Stammzellen auf. [119] Mesenchymale Stammzellen sind multipotente Zellen, die sich in verschiedene Zellen des Bindegewebes entwickeln können, darunter Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten [120].

Die Gewinnung von Zellen aus dem Blut der Herz-Lungen-Maschine gelingt, wie erstmals 1978 beschrieben, durch Dichtegradientenzentrifugation und Kultivierung der mononukleären Zellfraktion mit zellspezifischen Medien [121]. In der Zellkultur zeichnen sich EPC durch ein widerstandsfähiges Proliferationspotential mit Kolonieformationen aus [122].

#### **V.4.3 Zielsetzung**

In der folgenden Arbeit sollte die zuvor erstmals beschriebene Isolation von Zellen aus der HLM zum Tissue Engineering ausführlich untersucht und weiterentwickelt werden. In einer erhöhten Versuchszahl gegenüber der Erstbeschreibung wurden die zwei Methoden der Dichtegradientenzentrifugation aus dem Blut der HLM und der direkten Kultivierung von Filterstücken auf ihre Zuverlässigkeit untersucht und miteinander verglichen [100]. Unter der Kenntnis der früher genannten Informationen sollte die Isolationsmethodik optimiert werden, so dass eine erfolgreichere Zellgewinnung mit einer höheren Ausbeute an Zellen möglich war.

Die gewonnene Zellkulturen sollten durch spezifische immunhistochemische und immunfloureszierende Anfärbungen auf ihre Reinheit überprüft werden. Die Viabilität der Zellen wurde getestet und mit vaskulären EC und FB verglichen.

Erstmals sollte die Eignung der gewonnen Zellen für das kardiovaskuläre TE überprüft werden. Dabei wurde das Verhalten der Zellen unter Scherspannung untersucht und die spezifischen Veränderungen ausgewertet.

Anhand dieser Erkenntnisse soll so eine neue Zellquelle für das TE von Herzklappen evaluiert werden. Die Methodik sollte nicht, wie bei vielen bisher etablierten Zellquellen, einen zusätzlichen invasiven Eingriff beinhalten. Um für den Einsatz im klinischen Alltag praktikabel zu sein, soll die Methode kostengünstig und schnell umsetzbar sein. Die ethischen Hürden müssen für einen klinischen Zulassungsprozess geringgehalten werden.

Die gewonnenen Zellen müssen, gegenüber den Zellen bisher verwendeter Zellquellen, qualitativ gleichwertig oder überlegen sein.

So kann die individuelle Wahl einer Zellquelle für die autologe Transplantation einer TE Herzklappe, um eine zuverlässige neuartige Quelle erweitert werden.

## VI. Methoden

Im Folgenden werden die Methoden der Zellisolierung, Kultivierung sowie die Methoden der Zellevaluierung beschrieben. Eine Auflistung der Materialien, Lösungen und Geräte befindet sich im Anhang XII.1.

### VI.1 Zellisolierung

Die Zellisolierung erfolgte durch postoperative Gewinnung von EC und FB aus 20 HLM. Je HLM wurden zwei Isolationsmethoden getestet und miteinander sowie gegen vaskulär isolierte EC und FB verglichen.

#### VI.1.1 Patientenkollektiv

Alle 20 HLM, die zur Zellisolierung genutzt wurden, waren von Operationen an Patienten der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Operationsdatum, Patientenalter und Geschlecht sowie Bypasszeit wurden dokumentiert. Ausschlusskriterium war eine Bypasszeit von unter 60 min.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der LMU überprüft und genehmigt. Es liegt eine Unbedenklichkeitsbescheinigung vor. Die Materialien wurden nach vorangegangener freiwilliger und unterschriftlicher Zustimmung des Patienten in anonymisierter Form weiterverwendet.

#### VI.1.2 Zellgewinnung durch Dichtegradientenzentrifugation aus Blut und großporigem Filter

Im Anschluss an einen offenen herzchirurgischen Eingriff erfolgte der Abbau der HLM durch die Kardiotechnik. Nach vorangehend erfolglosen Zellisolationsversuchen (20 HLM) bei denen die Zellen nach dem Transport ausgetrocknet waren, wurden folgend die Zu- und Abflüsse des dualen Reservoirs (Inspire 6, Sorin Group, Mirandola, ITA) noch im Operationssaal abgeklemmt. Dies sollte die Verdunstung von Flüssigkeit und so ein Austrocknen der Zellen sowie eine Kontamination des Blutes durch Pathogene oder Toxine während des Transports verhindern. Zur raschen Weiterverarbeitung wurde das duale Reservoir in einem geschlossenen Transportgefäß in das Labor gebracht. Unter sterilen Bedingungen (Laminar Airflow Hera Safe, Kendro Lab Products, Hanau, GER) wurden 200 ml des drainierten Bluts in einen sterilen Kunststoffbehälter mit Schraubdeckel gefüllt. Das Blut wurde mit 200 ml phosphatgepufferter Saline (PBS, Biochrom GmbH, Berlin, GER) verdünnt. PBS als isotonische Pufferlösung, ermöglicht das Arbeiten bei

konstantem pH-Wert (7,4).

Das duale Reservoir wurde anschließend geöffnet und der Partikelfilter aus der Kardiotomie-Sektion sowie der Entschäumer aus dem Übergang zur venösen Sektion in 3 x 3 cm große Stücke geschnitten und in die Blut-PBS-Suspension im sterilen Kunststoffbehälter hinzugegeben.

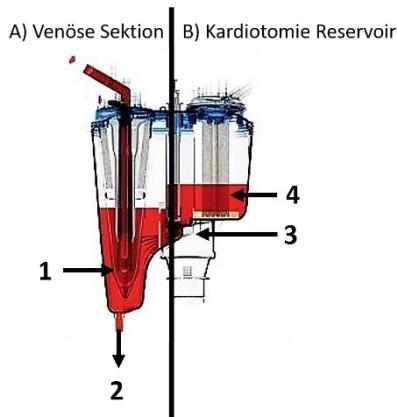


Abbildung 13: Aufbau des dualen Reservoirs der Herz-Lungen-Maschine. Die venöse Sektion (A), welche den zweiblättrigen Filter enthält befindet sich links; rechts: Das Kardiotomiereservoir (B), in welchen das Blut per Sauger aus dem Operationssitus sammelt und den Schaumstofffilter enthält; Im Versuchsaufbau verwendete HLM-Teile: 1: zweiblättriger feinporiger Filter, 2: Restblut + NaCl, 3: Schaumstoff aus Übergang zu venöser Sektion, 4: Schaumstofffilter für große Partikel

Bei 37 °C wurde die Lösung über 10 min mit einer Frequenz von 100/min im Inkubationsschüttler (KS 15 + TH15, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, GER) geschüttelt, um Zellen aus den Filtern auszuwaschen. Im Anschluss konnte die Suspension in 8 x 50 ml-Falconröhren überführt und für 10 min bei 450 g zentrifugiert werden. So wurde nach Abtragung des zellfreien Überstandes ein konzentriertes Zellpellet erzeugt, welches 1:1 mit Medium 199 (M199 Earle's, Biochrom GmbH) resuspendiert wurde. M199 ist eine Lösung mit Earle's Salzen, Zucker, Aminosäuren und Vitaminen, die als kurzfristige Nährstoffquelle für Zellen dient.

Nach Woywodt et al. sind EC und FB in der mononukleären Zellfraktion enthalten [123]. Um diese zu erhalten, erfolgte die Auf trennung des resuspendierten Zellpellets nun mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation [121].

### Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein physikalisches Trennverfahren für Partikel unterschiedlicher Dichte, die in einer Suspension enthalten sind. Die Auf trennung basiert

darauf, dass die Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel im Zentrifugalfeld dichteabhängig ist.

$$\vartheta = \frac{d^2(p_p - p_m)g}{18\eta}$$

$$S = \frac{\vartheta}{r\omega^2}$$

Formel 2: oben die Svedberg-Gleichung:  $\vartheta$  Sedimentationsgeschwindigkeit,  $d$  Durchmesser des Partikels,  $g$  relative Zentrifugalbeschleunigung,  $\eta$  Viskosität des Mediums,  $p_p$  Dichte des Partikels,  $p_m$  Dichte des Mediums; unten der Sedimentationskoeffizient  $S$ :  $\vartheta$  Sedimentationsgeschwindigkeit,  $r$  Rotorradius,  $\omega$  Winkelgeschwindigkeit [124]

Je größer der Dichtegradient des Partikels zum umgebenden Medium, desto schneller sedimentiert er aus. Dieser Vorgang ist zudem abhängig von dessen Durchmesser, der relativen Zentrifugalbeschleunigung sowie der Viskosität. Unter konstanten Bedingungen lässt sich so der Sedimentationskoeffizient eines Partikels im Zentrifugalfeld bestimmen (siehe Formel 2).

Der Sedimentationskoeffizient unterschiedlicher Zellpopulationen, welche sich in der Blutzellpelletsuspension befinden, liegt in einem engen Bereich von  $10^7$ - $10^8$  S. Für eine suffiziente Auf trennung bedient man sich eines umgebenden Mediums, das in seiner Dichte genau zwischen den gesuchten und den auszusortierenden Zellen liegt. [124]

Tabelle 5: Dichtebereiche und mittlere Dichte humaner Blutkomponenten [124]

Zellen + weitere Blutbestandteile	Dichtebereich [g/cm <sup>3</sup> ]	mittlere Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]
<b>Plasma/Serum</b>	-	1,026
<b>Thrombozyten</b>	1,040–1,060	1,058
<b>Monozyten</b>	1,059–1,068	1,065
<b>Lymphozyten</b>	1,066–1,077	1,070
<b>Basophile</b>	1,075–1,081	1,079
<b>Neutrophile</b>	1,080–1,099	1,082
<b>Eosinophile</b>	1,088–1,096	1,092
<b>Erythrozyten</b>	1,090–1,110	1,100

*Biocoll*® (Biocoll separating solution, Biochrom GmbH) ist ein solches Medium. Es enthält hydrophile Polysucrose, die in einer isotonischen Lösung physiologischen pHs gelöst ist. Die definierte Dichte von *Biocoll*® beträgt 1,077 g/ml (siehe Abbildung 14). Erythrozyten werden nachfolgend nicht benötigt und sind deswegen auszusortieren. Mit einer mittleren Dichte von 1,1 g/ml sind sie dichter als *Biocoll*® und werden am Boden

pelletieren, während die Zellen der mononukleären Zellfraktion mit den Lymphozyten und einem Anteil der basophilen Granulozyten leichter sind und sich in einer Interphase über dem *Biocoll*® und unter einem Überstand aus M199 (< 1,077 g/l) absetzen [124].

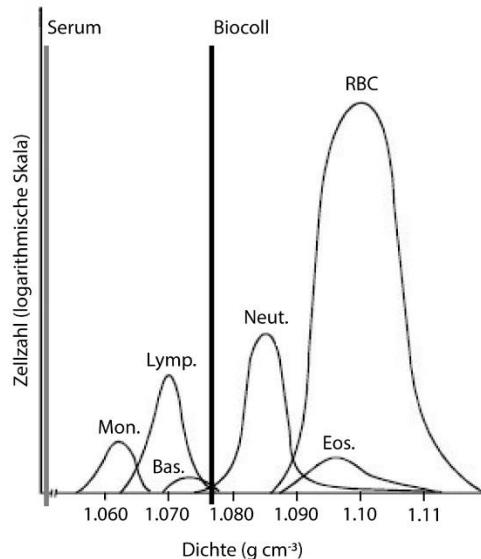


Abbildung 14: Dichte der Zellen im Blut (graue Linie Serum: 1,026 g/ml): Monozyten (Mon.), Lymphozyten (Lymp.), basophile Granulozyten (Bas.), neutrophile Granulozyten (Neut.), eosinophile Granulozyten (Eos.), rote Blutkörperchen (RBC); schwarze Linie beschreibt die Dichte von Biocoll (1,077 g/ml) [125].

## Durchführung

Je 35 ml der Blutzellpelletsuspension wurde vorsichtig auf 15 ml *Biocoll*® in ein 50 ml-Falconröhrenchen getropft. Hierbei war es wichtig, keine Verwirbelungen zu erzeugen, um die Auf trennung nicht mechanisch zu stören. Nach 25 min Zentrifugation bei 1000 g war die Suspension dichteabhängig in Fraktionen unterteilt. Der Überstand aus M199 konnte abpipettiert und verworfen werden. Der Zellring, der dem *Biocoll*® auflag, wurde vorsichtig abgetragen. Da *Biocoll*® über einen längeren Zeitraum zytotoxisch wirkt, sollte eine Kontamination im Folgenden vermieden werden.

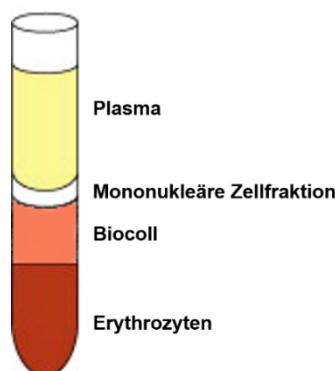


Abbildung 15: Auf trennung nach Dichtegradientenzentrifugation: oben Plasma (gelb), dann mononukleärer Zellring (weiß), Biocoll (hellrot), Erythrozyten (rot) unten im Falconröhrenchen [126]

Es folgten zwei Waschvorgänge, dem erhaltenen Zellpellet fügte man die dreifache Menge an M199 hinzu. Der erste Waschdurchlauf erfolgte für 10 min bei 300 g, der zweite Durchlauf für 10 min bei 200 g.

Das Zellpellet, das schlussendlich entstand, konnte mit 2 ml M199 resuspendiert werden. Je 1 ml Zellsuspension wurde in eine T12,5 Zellkulturflasche überführt und mit 4 ml Wachstumsmedium kultiviert (37 °C/ 5 % CO<sub>2</sub>). In je eine Zellkulturflasche wurde Fibroblastenwachstumsmedium (FB-GM, Fibroblast Cell Growth medium, Promocell GmbH), beziehungsweise Endothelzellwachstumsmedium (EC-GM, Endothelial Cell Growth medium, Promocell GmbH) zugefügt. Das GM setzte sich aus 500ml Wachstumsmedium, 10% Wachstumsfaktorenzusatz (Endothelial/Fibroblast Cell Growth Supplement, Promocell, 1% Penicillin-Streptomycin (Penicillin- Streptomycin Solution stabilized, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER) und 10% Fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom AG) zusammen.

### **VI.1.3 Zellgewinnung aus feinporigem Filter**

Zudem erfolgte die Zellgewinnung durch Kultivierung des zweiblättrigen feinporigen Filters der venösen Sektion in Fibroblasten-Wachstumsmedium.

Die Porengröße der Filter beträgt 41 µm und 120 µm. Der Längsschnitt einer EC beträgt im Durchschnitt 10-25 µm, einer CEC 10-100 µm, einer EPC < 20 µm und eines FB 50 µm [103, 127]. Da durch Nathusius et. al. mit dieser Methode keine EC gewonnen werden konnten, erfolgte die Kultivierung ausschließlich mit FB-GM [100].

Nach der Öffnung des dualen Reservoirs wurde unter sterilen Bedingungen die blutbedeckte Spitze des feinporigen Filters in drei 3,5 cm x 5 cm große Teile geschnitten. Die Filterteile wurden durch vorsichtiges Schwenken in M199 gewaschen und so von Erythrozyten befreit. Anschließend konnten die Filterteile in Zellkultur-Petrischalen platziert werden. Deckgläser, die mit Silikonpaste über den Filterstücken befestigt wurden, verhinderten die Bewegung der Gewebeteile im Wachstumsmedium. Die Filterstücke wurden mit je 12 ml FB-GM im Brutschrank kultiviert (37 °C/ 5 % CO<sub>2</sub>).

### **VI.1.4 Gewinnung der vaskulären EC und FB der Kontrollgruppe**

Für die Auswertung wurden als Kontrollgruppe vaskuläre EC und FB herangezogen, Die Gewinnung dieser erfolgte gemäß einem standardisierten Protokoll des Labors nach Bypassoperationen aus überschüssigem Material der V. saphena magna (2016).

EC konnten durch einen zweischrittigen enzymatischen Prozess mit einer Lösung welche Kollagenase enthielt aus der Gefäßwand gelöst werden. FB wurden durch die direkte Kultivierung von Gewebestücken mittels „Deckglasmethode“ gewonnen [128].

## VI.2 Zellkultur

Die folgenden Methoden wurden nach standardisierten Arbeitsanweisungen des Labors für Tissue Engineering (2016) durchgeführt: Ein partieller Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage. Proliferationsfortschritte wurden mikroskopisch beurteilt, dokumentiert und analysiert.

Um eine ausreichende Zellausbeute zur nachfolgenden Evaluation der Zellen zu erreichen, wurden die Zellreihen bei Konfluenz in größere Kulturflaschen passagiert. Die meisten Zellen sind jedoch nicht unbegrenzt teilungsfähig. Sie zeigen nach etwa  $50 \pm 10$  Populationsverdopplungen Seneszenz, dann ist das sogenannte Hayflick-Limit erreicht [129]. Zur verlängerten Haltbarkeit wurden die Zellen vor Weiterverarbeitung durchschnittlich nach Passage 3-5 kryokonserviert.

### VI.2.1 Passagieren

Wies der Zellrasen eine Konfluenz von 90 % auf, konnten die Zellen in größere Zellkulturflaschen überführt werden. Hierfür wurde das Kulturmedium komplett entfernt und die Flasche über 2 min mit PBS gewaschen (Details siehe Tabelle 6).

Anschließend konnten die Zellen während einer Inkubationszeit von 3 min (EC) beziehungsweise 5 min (FB; 37 °C/ 5 % CO<sub>2</sub>) mit dem proteolytischen Enzym Trypsin (Trypsin-EDTA Lösung (10 %), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, GER) vom Flaschenboden abgelöst werden. Wenn sich die Zellen nicht vollständig vom Boden lösten, wurde ein Zellschieber zu Hilfe genommen. Da Trypsin über einen längeren Zeitraum zytotoxisch ist, musste die Zell-Trypsin-Suspension nach der abgelaufenen Inkubationszeit in eine Stopplösung aus M199 und FCS überführt werden. Diese Lösung wurde dann für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes konnte das Zellpellet je nach Zelltyp in EC-GM beziehungsweise FB-GM resuspendiert und auf einer größeren Wachstumsfläche ausgebracht werden.

Tabelle 6: Arbeitsschritte zur Passage von Zellkulturen (SOP Labor Tissue Engineering)

Arbeitsschritt	Lösung	Zeit	T25	T75	T175
		[min]	[ml]	[ml]	[ml]
Waschvorgang	PBS	2	6	12	15
Inkubation mit proteolytischem Enzym	Trypsin	EC: 3; FB 5	1,5	3	5
Zentrifugation mit Stopplösung	M199 + FCS	5	7 + 2 3	8 + 9 + 5	
Zellpellet mit Wachstumsmedium aussähen	Wachstumsmedium		5	18	30

Die Wahl der Zellkulturflaschen ist in Abbildung 16 zu sehen. Je nach Zellzahl waren auch Abweichungen von diesem Plan möglich.



Abbildung 16: Passage auf nächstgrößere Wachstumsfläche bis zur Kryokonservierung. Tn: n=Wachstumsfläche in cm<sup>2</sup>.

### VI.2.2 Kryokonservierung

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen nach Passage 3-5 kryokonserviert. Hierzu wurde das Zellpellet nach Trypsinierung und Zentrifugation (siehe VI.2.1 VI.2) in einem Gefriermedium resuspendiert. Dieses Medium bestand aus Wachstumsmedium, FCS und dem organischen Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in einem Verhältnis von 70% / 20% / 10%. Nach der Zugabe von DMSO ist aufgrund dessen Zytotoxizität bei Raumtemperatur eine rasche Aufteilung der Suspension von je 1,5 ml in Kryoröhrchen und deren Lagerung bei -80 °C anzustreben. Die Zellen einer T175 Zellkulturflasche wurden in der Regel auf drei Kryoröhrchen aufgeteilt. In speziellen Einfrierbehältern werden die Zellen um 1 °C pro Minute heruntergekühlt.

FCS wirkt durch die enthaltenen Proteine, als Zellschutz im Gefrierprozess. DMSO verhindert als penetrierendes Gefrierschutzmittel die Bildung von Eiskristallen, welche die Zelle und ihre Organellen zerstören würden. [130]

### VI.2.3 Auftauen der Zellen

Um die Zellen aufzutauen, wurden je Kryoröhrchen 12 ml Auftaumedium, bestehend aus 80 % M199 und 20 % FCS (37 °C) vorbereitet. Die Kryoröhrchen konnten im Wasserbad bei 37 °C leicht angetaut werden. Anschließend wurde die angetaute Suspension aufgrund der Toxizität von DMSO bei Raumtemperatur möglichst zügig in das Auftaumedium überführt.

Die Suspension wurde über 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand an Auftaumedium abpipettiert. Das Zellpellet wurde in eine T75 oder T175 Zellkulturflasche ausgesät und mit 16 ml beziehungsweise 30 ml zellspezifischem Wachstumsmedium kultiviert (37 °C/ 5 % CO<sub>2</sub>).

### VI.2.4 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl, welche für bestimmte Versuchsaufbauten benötigt wird, wurde nach Trypsinierung und Zentrifugation das Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendiert. 10 µl Zellsuspension wurden mit 40 µl Trypanblau (Benzaminblau 0,4 %, Sigma Aldrich Chemie GmbH) vermischt. Trypanblau kann aufgrund seiner molaren Masse von M = 960,8 g/mol gesunde Zellmembranen nicht durchdringen und der anionen Farbstoff intrazellulär nicht an Proteine binden. So bleiben vitale Zellen hell. Avitale Zellen besitzen eine gestörte Membranbarriere und verfärben sich dunkelblau [130]. 10 µl der Trypanblau-Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop analysiert.

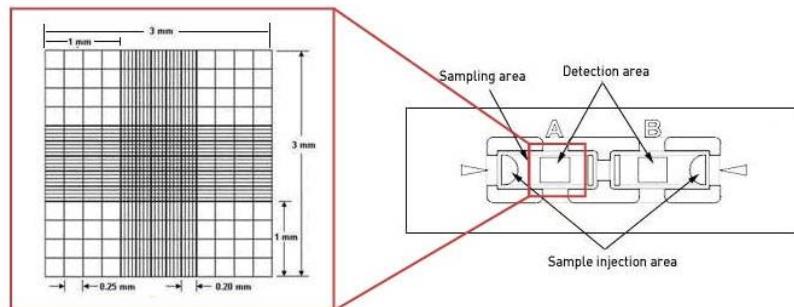


Abbildung 17: Neubauer-Zählkammer: Die Zellzählung erfolgte in den je 16 Quadranten (0,25x0,25 mm) der vier äußeren 1x1 mm großen Quadranten [131]

Die vitalen und avitalen Zellen in den vier äußeren großen weißen Quadranten wurden getrennt gezählt, siehe Abbildung 17.

Der Mittelwert der vier Quadrate konnte mit dem Verdünnungsfaktor 5 (Trypanblau zu Zellsuspension 4:1) und mit 10 multipliziert werden, so erhält man die Zellzahl je Mikroliter (siehe Formel 3: Zellzählung in Neubauer-Zählkammer. Formel für Berechnung der Zellzahl/ $\mu$ l).

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{Anzahl der Zellen in 4 Quadranten}}{4} \times 5 \times 10$$

Formel 3: Zellzählung in Neubauer-Zählkammer. Formel für Berechnung der Zellzahl/ $\mu$ l

## VI.3 Evaluation der Zellen

Die EC und FB wurden zwischen Passage 3 und Passage 6 untersucht. Zur Evaluierung der Zellen wurde eine WST-Zellviabilitätsbestimmung (Water-soluble tetrazolium salt), immunhistochemische Anfärbung, Immunfluoreszenz sowie ein Kultivierungsversuch unter Fluss mit anschließender Immunfluoreszenz durchgeführt.

### VI.3.1 WST-Zellviabilitätsbestimmung

## Hintergrund

Die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen wurde per Substratumsatz pro Zeit mittels WST-1-Zellviabilitätsbestimmung gemessen. Die Succinat-Tetrazolium-Reduktase, ein Teil des mitochondrialen Atmungskomplexes, spaltet das im Wachstumsmedium gelöste stabile hellrote Tetrazolium Salz WST-1 zu wasserlöslichem Formazan. Es erfolgt eine Gelbverfärbung des Mediums, welche durch konsekutive Änderung der optischen Dichte spektrophotometrisch bestimmt werden kann. Die spektrophotometrische Messwellenlänge beträgt 420-480 nm.

Die Änderung der optischen Dichte korreliert in ihrer Ausprägung direkt mit der Anzahl der vitalen Zellen, da die Bioreduktion von WST von der zellulären NAD(P)H (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) Produktion, also der glykolytischen Aktivität abhängig ist [124].

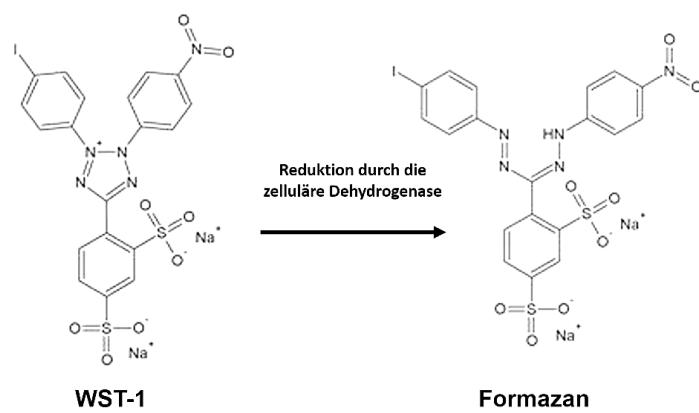


Abbildung 18: WST-Zellviabilitätsbestimmung. Reduktion von WST-1 zu Formazan durch die zelluläre Dehydrogenase, hierdurch kommt es zu einem Farbumschlag.

## Durchführung

Bei einer Konfluenz der Zellen von 90 % in den Zellkultur-Flaschen, konnten die Zellen trypsinisiert und zentrifugiert werden (siehe VI.2.1). Das Zellpellet wurde mit

Wachstumsmedium resuspendiert. In der Neubauer-Zählkammer erfolgte die Zellzählung mittels Trypanblaufärbung (siehe VI.2.4). Anschließend konnten je 50.000 Zellen je Well in eine 9-Well-Platte (Richtwert für FB  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät und mit 2 ml Wachstumsmedium kultiviert werden.

Im Abstand von je 24 h erfolgten drei spektrophotometrische Messungen. Hierzu wurden drei Wells, welche Zellen enthalten, sowie ein Well ohne Zellen als Leerwertkontrolle für 45 min mit je 500 µl WST/ Wachstumsmedium in einem Verhältnis von 1:10 (WST-1, Roche Diagnostics GmbH, GER) inkubiert (37 °C / 5 % CO<sub>2</sub>). Anschließend wurden dreimal 100 µl der WST/Wachstumsmediums-Lösung je Well in eine 96-Well-Platte überführt. Diese Platte wurde in einem Spektrophotometer (Multiscan Ex, Thermo electron corporation, CHN) platziert, welches die Messwerte in der Ascent Software am PC darstellte. Als Positivkontrolle dienten bekannte EC-/FB-Zelllinien, welche aus Venen isoliert wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel.

Die absoluten Werte der optischen Dichte wurden je Isolationsmethode und Wachstumsmedium mit der Kontrollgruppe verglichen. Da die optische Dichte jedoch von der Anzahl vitaler Zellen abhängig war, wurde zudem die Proliferationsrate verglichen. Zwar wurde die gleiche Anzahl an Zellen initial ausgesät, jedoch unterscheidet sich die Anzahl der Zellen, die nach 24 h adhärierten. Deshalb wurden zur Berechnung der Proliferationsrate die Werte der optischen Dichte nach 24 h als Referenzpunkt gesetzt und die Werte nach 48 h und 72 h auf diesen ersten Wert bezogen.

### **VI.3.2 Immunzytologie**

Zur Identifizierung und Typisierung der Zellreihen wurden immunologische Färbungen durchgeführt. Hierbei können durch Antikörperbindung spezifische Zellproteine sichtbar gemacht werden.

#### **Hintergrund**

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung basiert auf einer Antigen-Antikörperreaktion sowie der daran gekoppelten Enzym-Substratumsatz-(Chromogen)-Reaktion.

Bei allen immunologischen Färbungen binden Immunglobuline G als primäre Antikörper mit der Fab-Region (Antigen-binding-fragment) an zellspezifische Epitope (meist Proteine oder Nucleinsäuren). Ein sekundärer Antikörper ist gegen die Spezies des ersten Antikörpers gerichtet und bindet mit seiner Fab-Region an der Fc-Region (crystallisable-fragment) des ersten Antikörpers. Die Antikörper entstammen einer unterschiedlichen

Spezies als das untersuchte Material (Mensch), um unspezifische Bindung zu verhindern. Sekundäre Antikörper fungieren als Signalverstärkung, da mehrere sekundäre an einen primären Antikörper binden können, so ist die Methodik sensitiver und deshalb auch durch den Verbrauch geringerer Mengen an primären Antikörpern preiswerter.

Bei der Immunhistochemie im vorliegenden Versuchsaufbau ist der sekundäre Antikörper biotinyliert, bindet also kovalent Biotin.

Das Enzym, welches durch Enzym-Substratumsatz-(Chromogen)-Reaktion zur Anfärbung eingesetzt wird, ist die Meerrettich-Peroxidase (HRP, Horseradish peroxidase). Mit einem Molekulargewicht von 40kDa kann das Enzym gut die Zellmembran durchdringen und auch intrazelluläre Epitope markieren. Die HRP oxidiert Hydrogenperoxid zu Wasser und den Elektronendonator AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) zu einem wasserunlöslichen, roten Niederschlag [132]. Dieser Niederschlag ist im Lichtmikroskop detektierbar. HRP ist an den Signalverstärker Streptavidin gebunden, ein Protein, das aus den Bakterien *Streptomyces avidinii* gewonnen wird. Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, so dass ein weiterer HRP-Streptavidin-Komplex an das Biotin des sekundären Antikörpers binden kann. Streptavidin fungiert als Signalverstärker, da je sekundärem Antikörper mehrere Komplexe binden können, so dass es zu mehr Farbniederschlag pro Fläche kommt [133].

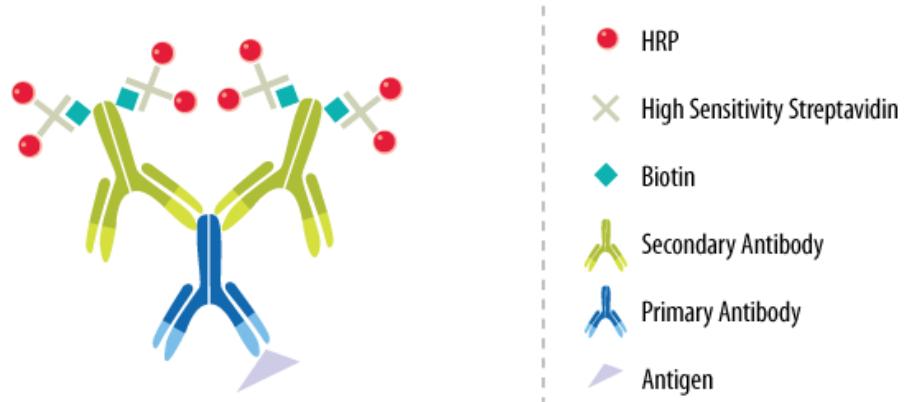


Abbildung 19: Färbevorgang der Immunhistochemie: Primäre Antikörper (blau) binden an das Antigen des Gewebes (grau), sekundäre biotynilierte Antikörper (grün) binden am ersten Antikörper, der Streptavidin-HRP-Enzymkomplex (grau und rot) bindet wiederum am Biotin (blau) des sekundären Antikörpers [134].

Die im Versuchsaufbau gewählten Antikörper dienten der Identifizierung der FB (TE-7) und EC (VE-Cadherin, PECAM, vWF), welche im TE von Herzklappen eingesetzt werden, sowie dem Ausschluss von Kokulturen mit Herzmuskelzellen (Myosin heavy chain), glatter Muskulatur (SMC) und Myofibroblasten ( $\alpha$ -Aktin), siehe Tabelle 7.

Alle im Folgenden verwendeten Marker waren im Labor vorbekannt und die optimale Verdünnung im Färbevorgang bereits evaluiert. Für den Herzmuskelmarker Anti-Myosin heavy chain gab es kein standardisiertes Laborprotokoll. Deshalb wurde durch die Anfärbung von Herzmuskelzellen der Marker auf seine Färbeeigenschaften getestet und eine Verdünnungsreihe zur Evaluierung der optimalen Verdünnung erstellt.

Hierfür wurde humaner Herzmuskel durch eine aufsteigende Alkoholreihe in Paraffin gebettet, die Paraffinschnitte auf Objektträgern in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert und in den Verdünnungen 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000 mit immunfluorochromen sekundären Antikörpern gefärbt. Unter dem Immunfluoreszenzmikroskop wurde, um unspezifische Bindungen zu vermeiden, der Schnitt mit der stärksten Verdünnung bestimmt, welcher noch zu einer ausreichenden Anfärbung führt.

Tabelle 7: Immunhistochemische Primärantikörper und deren Eigenschaften [135].

Bindungsstelle der primären Antikörper	Synonyme	Exprimierende, gesuchte Zellen	weitere exprimierende Zellen	Funktion des Proteins	Verdünnung des Antikörpers
VE-Cadherin	CD144	EC		Kalzium-abhängige Zelladhäsion	1:200
PECAM	CD31	EC	Makrophagen, Mono-, Lympho-, Granulo-, Thrombozyten	Zelladhäsion, Aktivierung und Migration	1:40
vWF	F8VWF	EC	Megakaryozyten	Thrombozytenadhäsion, Hämostase-Funktion	1:200
TE-7	Anti-Fibroblast Antibody	FB	Thymische Stomazellen		1:150
SMC	Smooth Muscle Cell Marker	SMC (glatte Muskelzellen)	Myoepitheliale Zellen	Kontrakiles Protein	1:40
Myosin Heavy Chain	MYH6, MYHC; MYHCA	Herzmuskel	Skelettmuskel	Kontrakiles Protein	1:200
$\alpha$ -Aktin	Anti-alpha smooth muscle Actin antibody	SMC, Myofibroblasten	Myoepitheliale Zellen	Zytoskelett	1:100

## Durchführung

Nach Trypsinierung und Zählung der Zellen (siehe VI.2.4), konnten 15.000 Zellen je Well in einen 8-Well-Objektträger ausgesät werden. Im Inkubator (37 °C/ 5 % CO<sub>2</sub>) adhärierten die Zellen über eine Stunde. Anschließend wurde der 8-Well-Objektträger mit Wachstumsmedium über Nacht im Brutschrank kultiviert. Konnte am nächsten Tag bei der mikroskopischen Evaluation die Konfluenz der Zellen

festgestellt werden, wurde das Wachstumsmedium vollständig entfernt und die Zellen mit PBS für 2 min gewaschen. Im Anschluss folgte die Fixierung der Zellen in -80 °C vorgekühltem 96 %-igem Ethanol. Ethanol konserviert die Zellen und fixiert die Zellmorphologie.

Die Objektträger wurden nun ohne Kammeraufsatz weiterverarbeitet. Nach dem ersten Waschdurchlauf in PBS für 2 x 3 min wurden für 10 min die endogenen Peroxidasen in 1: 200 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + PBS (Wasserstoffperoxid 30 %, Merck KgaA) abgesättigt. Dieser Schritt verhindert durch Blockierung endogener substratspezifischer Enzyme falsch-positive Ergebnisse.

Nach erneutem Waschdurchlauf mit PBS (2 x 3 min) wurde der Primärantikörper in Antikörper-Verdünnungsmittel aufgetragen, Verdünnungen siehe Tabelle 7 (Antibody Diluent, DakoCytomation). Der primäre Antikörper wurde für 30 min inkubiert, anschließend die ungebundenen Antikörper mit PBS gründlich abgewaschen.

Die biotinylierten zweiten Antikörper (Goat Anti-Mouse und Goat Anti-Rabbit, CytoScan-Biotinylated Link, Cell Marque, Sigma Aldrich Chemie GmbH) fungierten als Brückenantikörper und wurden im nächsten Schritt auf die Zellen aufgetropft und für 10 min inkubiert. Auf einen weiteren Waschdurchgang folgte die Inkubation der Zellen für 10 min mit dem Enzymkomplex HRP Streptavidin Link (Cytoscan HRP Label, Cell Marque, Sigma Aldrich Chemie GmbH, GER). Nach erneutem Auswaschen wurden die Zellen für 10 min mit dem AEC-Peroxidase Substrat inkubiert (5 ml Aqua dest + 2 Tropfen Pufferlösung + 3 Tropfen Farbsubstrat + 2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ampuwa Aqua ad injectabilia, Fresenius Kabi, GER, AEC Substrate Kit, Vector Alexis, GER). Dieses wurde mit Leitungswasser für 2 min abgespült. Mit Meyers Hämalaunlösung 1:4 in PBS (Merck KGaA, GER) erfolgte für 2 min eine Gegenfärbung der Zellkerne. Die Objektträger wurden dann für 5 min mit Leitungswasser gesäubert und gebläut und anschließend mit wässrigem Eindeckmedium und Deckglas eingedeckt. Die Objektträger wurden unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 35, Carl Zeiss GmbH, GER) betrachtet, digitalisiert (Leica DMR, Leica Camera AG, GER) und dokumentiert.

Die Auswertung erfolgte visuell im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Beurteilung der Markerexpression erfolgte anhand der Leuchtkraft, der quantitativen Verteilung des Markers innerhalb der Zellen beziehungsweise der Anzahl der gefärbten Zellen. Die Färbung wurde dann im Hinblick auf die Anfärbung als negativ, schwach, stark und sehr stark angefärbt kategorisiert.

Jeder Färbedurchlauf beinhaltete eine Positivkontrolle mit bekannten EC und FB sowie eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper zur Detektion von Hintergrundfärbung oder falsch positiven Reaktionen.

### VI.3.3 Immunfluoreszenz

#### Hintergrund

Analog zur Immunhistochemie gelingt mit der Immunfluoreszenz der Nachweis zellspezifischer Makromoleküle (meist Proteine oder Nucleinsäuren) sowie deren Lokalisation innerhalb der Zelle mittels eines primären Antikörpers. Dieser ermöglicht eine Bindung der sekundären Antikörper, welche mit fluorochromen Farbstoffen konjugiert sind.

Das Fluoreszenzmikroskop regt Fluorochrome durch Bestrahlung der Zellen bei definierter Wellenlänge (vorbekannte Absorptionsmaxima) zur Absorption von Photonen an. Hierdurch erfolgt der Übergang von Elektronen in ein energiereicheres Niveau. Kurz darauf geben die Fluorochrome die Energie wieder frei und es ist möglich die spontane Emission von Licht zu messen.

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper und deren Eigenschaften.

Sekundäre Antikörper	Bindungsstruktur	Fluoreszenz-konjugat	Wellenlänge, $\lambda_{\text{ex}}$ ; $\lambda_{\text{em}}$ [nm]	Verdünnung des Antikörpers
<b>Anti-Mouse</b>	IgG (H+L), polyklonal, Wirt: Donkey	Alexa Fluor	555; 565	1:500
<b>Anti-Rabbit</b>	IgG (H+L), polyklonal, Wirt: Goat	CF	488; 515	1:1000
<b>DAPI</b>	Bindet dsDNA		359; 461	1:1000
<b>Sir-Aktin</b>	Jasplakinolide bindet F- Aktin	Fluorophores Silicon Rhodamin, Cy5	652; 674	1:1000

#### Mesenchymale Stammzellen

Um die Existenz von Stammzellen zu untersuchen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit den Markern CD45 (Cluster of Differentiation), CD73, CD90 und CD105 durchgeführt. Die Positivität von CD73, CD90 und CD105 sowie die Negativität von CD45 sind die von Dominici et al. beschriebenen minimalen Voraussetzungen zur Identifikation mesenchymaler Stammzellen [136].

Tabelle 9: Primäre Antikörper der Stammzellfärbung und deren Eigenschaften [135].

Bindungsstellen primärer Antikörper	Synonyme	Exprimierende Zellen	Funktion des Proteins	Verdünnung des Antikörpers
CD73	Ecto-5-nucleotidase	B-Zell-Subpopulationen, T-Zell-Subpopulationen, dendritische Zellen, Endothel-, Epithelzellen	Ecto-5'-Nucleotidase, dephosphoryliert AMP, kann co-stimulatorisch bei der T-Zell- Aktivierung wirken	1:200
CD90	Thy-1	CD34+-proThymozyten, Thymozyten, T-Zellen	beteiligt an der Wanderung von Leukozyten zum Entzündungsort	1:10
CD105	Endoglin	Endothel, Makrophagen	regulatorische Komponente des TGFβ-Rezeptors	1:200
CD45	Leukocyte common antigen (LCA), T200, B220	Alle hämatopoetischen Zellen	Tyrosinphosphatase, erhöhte Signalisierung durch Antigen Rezeptoren von B und T Zellen	1:50

## Durchführung

Die Färbung wurde beispielhaft an zwei Zelllinien durchgeführt. Eine Zelllinie, die mit EC-GM kultiviert wurde und eine mit FB-GM kultivierte Zelllinie. Die Färbung erfolgte entsprechend eines Protokolls des Labors für Biomechanik, der Orthopädischen Klinik und Poliklinik. Die zu untersuchenden Zellen wurden, wie in VI.3.2, in 8-Well-Platten kultiviert und nach Entfernung des Wachstumsmediums mit PBS für 2 min gewaschen. Anschließend wurden die Zellen über 10 min mit 4 °C kaltem Paraformaldehyd (PFA; 4 %) fixiert. PFA vernetzt Proteine reversibel und konserviert so die Zellen.

Mit einem Waschpuffer bestehend aus 1 l PBS und 1 ml Brij (Merck KgaA) wurden die Zellen für 3x5 min gespült. Das Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen zur Reduzierung von Hintergrundstrahlung erfolgte mit 5 % Bovinem Serum Albumin (BSA, Sigma Aldrich Chemie GmbH) für 30 min bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde vollständig entfernt und der primäre Antikörper in PBS mit 5 % BSA aufgetragen (Verdünnung siehe Tabelle 9) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der primäre Antikörper vollständig entfernt und die Zellen 3 x 5 min mit dem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellmembranen mit 0,1 % Triton-X-100 (Carl Roth GmbH) in PBS für 15 min permeabilisiert. Triton-X löst Proteine aus den Zellmembranen und macht diese dadurch durchlässig für die Antikörper. Nach einem weiteren Waschdurchlauf konnte der sekundäre Antikörper in PBS verdünnt aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nachdem dieser gründlich mit dem

Waschpuffer entfernt wurde, konnten die Zellkerne mit DAPI 1:1000 in PBS über 5 min gegengefärbt werden. DAPI wurde mit dem Waschpuffer abgewaschen, die Kammern des Objektträgers entfernt und die Wells mit *Ibidi*® Mounting Medium und Deckglas eingedeckt. Eine Negativkontrolle, die ohne ersten Antikörper gefärbt wurde, wurde durchgeführt, um unspezifische Signale zu detektieren.

Mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer, Zeiss MicroImaging GmbH) wurden Bilder aufgenommen und dokumentiert.

## VI.4 Zellkultivierung unter Fluss

EC sind *in vivo* dem kontinuierlichen Blutfluss ausgesetzt und passen sich diesem an. Deshalb wurde ein Versuchsaufbau konzipiert, welcher den Blutfluss *in vivo* simuliert. Hierbei wurden die EC für 24h unter Fluss kultiviert und anschließend untersucht.

### Hintergrund

Zur Flussgenerierung wurde ein Pumpensystem von *Ibidi*® verwendet, welches aus einer Pumpe, einer Flusseinheit, einem Perfusionsset, der Computersoftware und den Kanalobjektträgern besteht (siehe Abbildung 20).

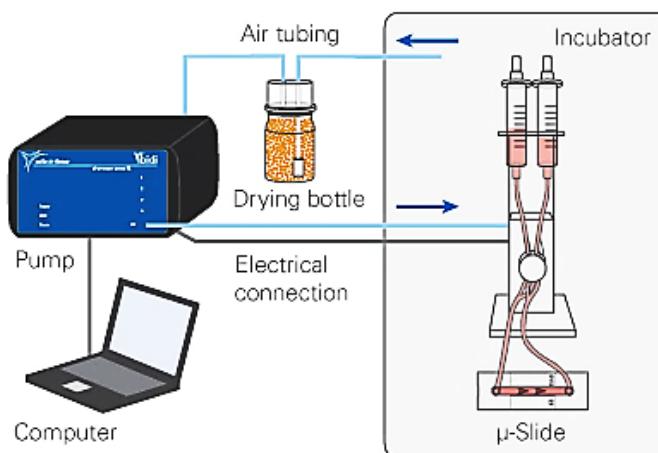


Abbildung 20: Aufbau des Flussversuches: Der Kanalobjektträger ( $\mu$ -Slide) wird an die Flusseinheit angeschlossen, die sich im Inkubator befindet. Diese ist über einen Schlauch an der Pumpe angeschlossen, welche durch den Computer gesteuert wird [137].

Die *Ibidi*® -Pumpe ist eine computergesteuerte Lufterdruckpumpe, welche an die Flusseinheit angeschlossen ist. Die Flusseinheit steht im Inkubator und reguliert über die Druckluft aus der Pumpe die Flussgeschwindigkeit und -richtung des Zellmediums im Kanalobjektträger. Durch elektrische Ansteuerung von Ventilen wird in gekreuzten Schlauchsystemen der Lufterdruck sowie der Medienfluss kontrolliert, sodass die

Flussrichtung unidirektional, oszillierend oder pulsatil erfolgen kann. Im folgenden Versuch erfolgte der Fluss unidirektional (siehe Abbildung 21).

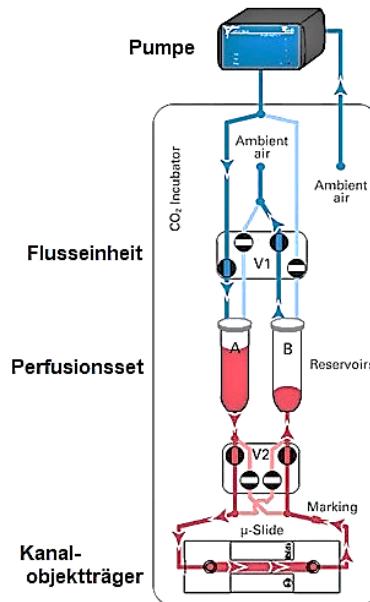


Abbildung 21: Aufbau des Pumpensystems bestehend aus der Pumpe, welche durch Luftdruck, die im Inkubator stehende Flusseinheit ansteuert. Durch Ventile wird der Fluss im Perfusionsset reguliert, sodass im Kanalobjektträger ein laminarer und unidirektionaler Fluss entsteht [137].

Das Perfusionsset dient als Zellmedienreservoir mit  $2 \times 5 \text{ ml}$  und wird in der Flusseinheit an die Druckluft sowie über Schläuche (innerer Durchmesser:  $1,6 \text{ mm}$ ) an die Kanalobjektträger als geschlossenes System steril angeschlossen.

Der Kanalobjektträger hat eine Kanalhöhe von  $0,4 \text{ mm}$ , ist  $5 \text{ mm}$  breit, mit einem Volumen von  $100 \mu\text{l}$  und einer Wachstumsfläche für die Zellen von  $2,5 \text{ cm}^2$ . Der Boden des Kanals ist mit Kollagen Typ IV beschichtet, um die Anhaftung der EC zu ermöglichen.

Die Computersoftware *PumpControl V 1.5.2*, die den Luftdruck und die Regulation der Klappen steuert, errechnet über die Flussrate die Scherspannung und die Scherrate. Die Scherspannung ist definiert als die Kraft, die auf die Zellen an der Gefäßwand einwirkt. Sie wird angegeben in  $\text{dyn/cm}^2$  und errechnet sich wie folgt:

$$\tau = \eta \times 131,6 \times \Phi$$

Formel 4: Berechnung der Scherspannung in einem rechteckigen Kanal: Zur Berechnung der Scherspannung ( $\tau$ ) wird die  $[\text{dyn/cm}^2]$  dynamische Viskosität ( $\eta$ )  $[\text{dyn*s/cm}^2]$  mit dem Faktor 131,6, welcher auf Kanalgröße beruht und der Flussrate ( $\Phi$ )  $[\text{ml/min}]$  multipliziert.

## Durchführung

Vor Beginn des Versuches musste das System kalibriert werden. Hierzu wurde die Viskosität des Fluids (Wachstumsmedium mit 10 % FCS bei 37 °C) von  $0,0072 \frac{\text{dyn}\times\text{s}}{\text{cm}^2}$  (durch den Hersteller vorgegeben) in die Software eingetragen. Durch viermalige manuelle Messung bei einer definierten Scherspannung von  $10 \text{ dyn/cm}^2$  wird ein Mittelwert gebildet und die Flussrate  $\Phi$  [ml/min] berechnet, siehe Formel 5. Diese wird in der Software eingetragen, welche automatisch einen Rekalibrierungsfaktor berechnet. Scherspannung und Scherrate werden ebenfalls durch die Software berechnet.

$$\Phi \left[ \frac{\text{ml}}{\text{min}} \right] = \frac{2 \text{ ml} \times 60 \frac{\text{s}}{\text{min}}}{t \text{ [s]}}$$

Formel 5: Errechnung der Flussrate. Die Flussrate ergibt sich durch Eintragung des Durchschnitts der viermaligen Messung der Zeit  $t$  [s], in der 2 ml Medium durch die Pumpe fließen.

Um eine konstante Scherspannung zu erhalten, ist eine Blasenbildung innerhalb der Schlauchsysteme des Perfusionssets zu vermeiden. Hierzu wurden die Kanalobjektträger und das Perfusionssystem zwei Stunden vor Versuchsbeginn im Brutschrank auf 37 °C akklimatisiert. Durch ein spezielles oszillierendes Hochdruckprogramm konnten Luftblasen nach Befüllung des Perfusionssets mit Zellmedium und Anschluss an Flusseinheit und Pumpe aus dem Perfusionsset entfernt werden.

Um den physiologischen Fluss an der Aortenklappe mit einer Scherspannung von  $10-17 \text{ dyn/cm}^2$  zu simulieren, wurde ein Versuchsaufbau gewählt, bei dem die Scherspannung schrittweise um  $5 \text{ dyn/cm}^2$  von 5 bis  $20 \text{ dyn/cm}^2$  gesteigert wurde.

Für den Flussversuch wurde je Endothelzellreihe ein Kanalobjektträger über 24 h unter Flussbedingungen kultiviert, während ein zweiter Kanalobjektträger derselben Endothelzellreihe als statische Kontrolle, ohne Fluss im Brutschrank kultiviert wurde.

300.000 Endothelzellen wurden nach Trypsinierung und Auszählung (siehe VI.2.4) je Kanalobjektträger in  $100 \mu\text{l}$  EC-GM in den Kanal ausgesät und zur Adhäsion für zwei Stunden bei statischen Bedingungen im Brutschrank kultiviert. Nach einer Stunde konnten die Flüssigkeitsreservoirs mit  $150 \mu\text{l}$  Medium aufgefüllt werden. Mikroskopisch wurde anschließend die Adhärenz sowie Konfluenz der Zellen festgestellt.

Die Kanalobjektträger wurden an das mit EC-GM befüllte Perfusionsset angeschlossen und mit der Flusseinheit im Brutschrank platziert.

Das Computerprogramm wurde mit den standardisierten Einstellungen für den Flussversuch über 24 h gestartet. Die Flussparameter sind in Tabelle 10 zu sehen. Ein Zyklus dauerte 6 h.

Tabelle 10: Zyklen mit Parametern des Flussversuchs; steigende Scherspannung; Zeit des jeweiligen Zyklus; automatisch errechnete Flussrate und Scherspannung

Zyklus	Scherspannung [dyn/cm <sup>2</sup> ]	Zeit [h]	Flussrate [ml/min]	Scherrate [1/s]
1	5	1-6	5.27	694
2	10	7-12	10.55	1389
3	15	13-18	15.82	2082
4	20	19-24	21.10	2778

Nach 24 h endete der Fluss automatisch und die Kanalobjektträger konnten vom Perfusionssystem entfernt und weiterverarbeitet werden.

## VI.5 Evaluation der Zellen unter Fluss

Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Kanalobjektträger unter Fluss per Immunfluoreszenz gefärbt, die Färbungen visuell ausgewertet und quantifiziert sowie mit der statischen Kontrolle verglichen.

Für die Auswertung der Effekte der Scherspannung wurde die Konfluenz der EC unter dem Mikroskop verglichen. Eine Konfluenz über 90% wurde als positiv gewertet. Die Ausrichtung der Zellen wurde subjektiv mikroskopisch ausgewertet. Eine positive Veränderung wurde angenommen, wenn die längere Achse der Zelle parallel zur Flussrichtung lag. Proliferation sowie Quantifizierung der Zell-Zell-Verbindungen wurden durch das Bildbearbeitungsprogramm *ImageJ* (National Institute of Health, Version 1.51j8, USA) analysiert, wie in VI.5.2 und VI.5.3 beschrieben.

### VI.5.1 Immunfluoreszenz

Hintergrund der Immunfluoreszenz siehe VI.3.3. Die EC wurden nach Kultivierung unter Fluss mit Antikörpern gegen das Adhäsionsmolekül VE-Cadherin sowie gegen F-Aktin gefärbt und mit der statischen Kontrolle verglichen. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI.

Nach Beendigung des Flussversuches konnten die Kanalobjektträger vom Perfusionsset entfernt und der Kanal mit jeweils 1 ml PBS gespült werden, genauso die statische Kontrolle.

Zur Fixierung inkubierten die Zellen über 10 min mit 4 % PFA. Nach Spülung des Kanals mit 1 ml PBS folgte das Permeabilisieren der Zellmembranen mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS über 5 min. Nach einem weiteren Spülgang wurden die Zellen mit 1 % BSA in PBS über 20 min geblockt.

Im Anschluss konnte der primäre Antikörper VE-Cadherin (1:200 in 1 % BSA in PBS gelöst; siehe Tabelle 7) aufgetragen und die Zellen über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Am nächsten Morgen wurden die Kanäle gewaschen und die Zellen mit dem zweiten Antikörper Goat Anti-Mouse (1:500) zusammen mit Sir-Aktin (1:1000; siehe Tabelle 8) und Verapamil (1:1000), in 1 % BSA in PBS verdünnt über 90 min inkubiert. Verapamil wird als Wirkverstärker von Sir-Actin eingesetzt, da es die  $\text{Ca}_2$ -Kanäle der Zellen inhibiert, die Sir-Actin unerwünschter Weise aus der Zelle transportieren. Nach erneutem Waschen der Zellen erfolgte die Gegenfärbung mit DAPI in PBS 1:1000 für 5 min. Die Kanäle wurden gespült und mit *Ibidi Mounting Medium*® eingedeckt. Fluoreszenzbilder wurden mit dem Mikroskop und der *Axiovision*-Software angefertigt.

### **VI.5.2 Proliferationsbestimmung durch Zellzählung mit ImageJ**

Der Vergleich der Proliferation erfolgte unter der Annahme, dass zu Versuchsbeginn in beide Kanalobjektträger einer Zellreihe etwa gleich viele Zellen ausgesät wurden (~300.000), sodass nach 24 h eine unterschiedliche Zellzahl auf unterschiedlichen Proliferationsraten, resultierend aus verschiedenen Kultivierungsbedingungen, beruhen musste. Zellreihen, bei denen nach Flusskultivierung keine Konfluenz vorlag, wurden unter der Annahme ausgeschlossen, dass die Zellen während der Flusskultivierung nicht adhären geblieben waren und so die Proliferationsrate fälschlich als zu gering bestimmt werden würde.

Zur automatischen Auszählung der EC wurde das Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ* verwendet. Hierfür wurden die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der DAPI-Zellkernfärbung in je 20- und 40-facher Vergrößerung verwendet und die Zellkerne gezählt.

Das Bild wurde binär in Schwarz und Weiß verwendet und dafür manuell ein Schwellenwert so gewählt, dass alle Zellkerne abgebildet waren, aber kein Hintergrund angefärbt wurde. Anschließend wurde das Bild in eine Maske konvertiert und

zusammenliegende Zellkerne mittels der Wasserscheidenfunktion getrennt. Zuletzt konnten die Partikel analysiert werden. Die Größengrenzwerte, ab der die Partikel gezählt werden sollten, wurde auf 5 Pixel<sup>2</sup> festgelegt, um Artefakte von der Zählung auszuschließen. Die Ergebnisse wurden tabellarisch festgehalten.

Die Abfolge der Befehle in ImageJ (Version 1.51j8) war wie folgt:

1. Image → Adjust → Threshold
2. Process → Binary → Convert to mask
3. Process → Binary → Watershed
4. Analyze → Analyze Particles:  
Size: 5-Infinity, Exclude on edges, Display results, Clear results,  
Summarize

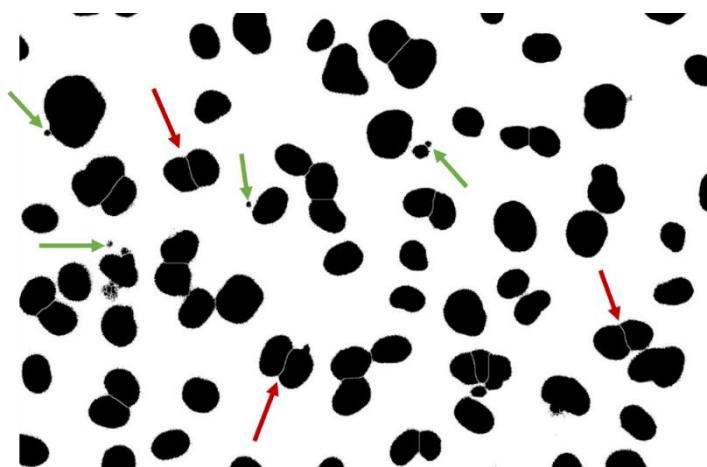


Abbildung 22: Verarbeitetes Immunfluoreszenzbild in ImageJ: Darstellung der Zellkerne in schwarz. Trennung zusammenliegender Zellkerne durch die Wasserscheidenfunktion, im Bild exemplarisch durch rote Pfeile markiert. Ausschluss von Partikeln, welcher kleiner 5 Pixel<sup>2</sup> groß waren, siehe exemplarisch grüne Pfeile.

### VI.5.3 Quantifizierung der Zell-Zell-Kontakte mit ImageJ

Für die Quantifizierung der Zell-Zell-Kontakte wurden die Bilder der Fluoreszenzfärbung mit dem VE-Cadherin-Antikörper verwendet. VE-Cadherin vermittelt die Zell-Zellverbindung zwischen den EC. Bei gleicher Belichtungszeit aller Aufnahmen gilt: Je mehr Zell-Verbindungen vorhanden sind, desto mehr Antigen-Antikörper-Bindungen in der Fluoreszenzfärbung. Hieraus resultiert ein stärkeres Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einer konsekutiv helleren Darstellung im Bild.

In dem Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ* konnte der mittlere Grauwert sowie die korrelierende integrierte Dichte (Produkt des mittleren Grauwerts und der Fläche) des Fluoreszenzsignals des Bildes gemessen werden [138]. Die Werte wurden tabellarisch dokumentiert.

Die Abfolge der Befehle in ImageJ (Version 1.51j8) zur Auswertung der Fluoreszenzintensität war wie folgt:

1. Analyze → Set Measurements:  
Area, Mean gray value, Min & max gray value, Integrated density
2. Analyze → Measure

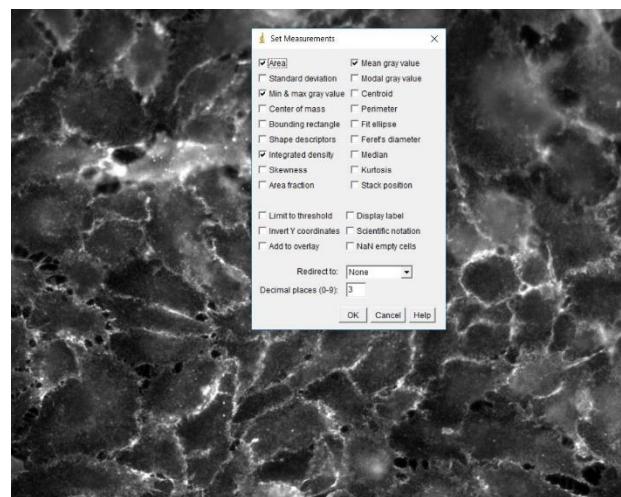


Abbildung 23: Verarbeitetes Bild in Image J (Version 1.51j8): Einstellungen zur Quantifizierung der Zell-Zell-Kontakte

## VI.6 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden tabellarisch in Microsoft Excel<sup>®</sup> (Version 1912) dokumentiert und ausgewertet. Mittelwerte werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden durch den ungepaarten t-Test überprüft. Das Konfidenzintervall wurde als signifikant\* bei  $p < 0,05$ , hochsignifikant\*\* bei  $p < 0,01$  und höchstsignifikant\*\*\* bei  $p < 0,001$  festgelegt. Grafiken wurden mit *GraphPadPrism*<sup>®</sup> erstellt.

## VII. Ergebnisse

### VII.1 Patientenkohorte

20 Reservoir der HLM wurden postoperativ für die Versuchsreihe verwendet. Der Altersdurchschnitt, der an der HLM operierten Patienten, lag zum Operationszeitpunkt bei  $67,8 \pm 11,9$  Jahren. 12 Patienten waren männlich, 8 Patienten weiblich, siehe Abbildung 24 und Tabelle 11.

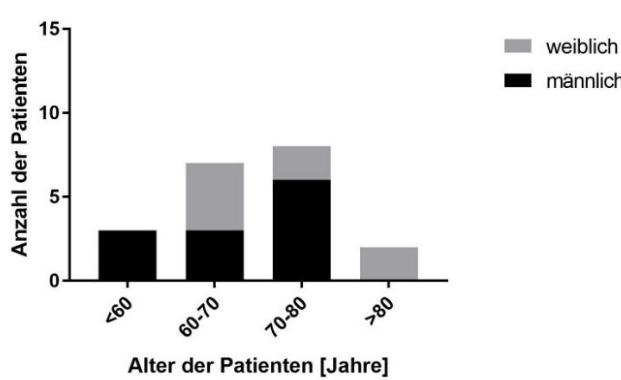


Abbildung 24 oben: Alter in Jahren und Geschlechtsverteilung der Patienten.

Tabelle 11 rechts: Patientenkohorte der 20 HLM. Verteilung von Alter in Jahren, Geschlecht und der Bypasszeit des kardiopulmonalen Bypasses während der Operation in Minuten.

Zellreihe	Alter [Jahre]	Geschlecht	Bypasszeit [min]
1	87	w	82
2	68	w	120
3	75	w	66
4	47	m	156
5	72	m	93
6	74	m	102
7	66	w	179
8	71	m	198
9	73	w	102
10	70	m	183
11	80	m	138
12	52	m	296
13	74	m	87
14	33	m	113
15	64	m	159
16	65	m	76
17	63	w	154
18	69	w	60
19	81	w	143
20	72	m	140

Die Zeit des kardiopulmonalen Bypasses während der Operation am Patienten, betrug  $132,4 \pm 54,4$  min.

## VII.2 Zellkultur

Eine erfolgreiche Zellisolierung gelang aus 17 von 20 Reservoiren der HLM. Insgesamt entstanden daraus 41 Zelllinien, siehe Abbildung 25. Die zwei unterschiedlichen Isolierungsmethoden wiesen vergleichbare Erfolgsquoten auf. Aus dem Zellpellet, welches durch die Dichtegradientenzentrifugation (DG) gewonnen und mit EC-GM kultiviert wurde ( $EC_{DG}$ ), wurden aus 15 von 20 Reservoiren der HLM Zelllinien kultiviert. Bei gleicher Methodik, jedoch mit FB-GM kultiviert ( $FB_{DG}$ ), konnten 13 Zelllinien isoliert werden (siehe VI.1.2). Gleich viele Zellreihen wurden durch die Isolation von Zellen aus dem Filtergewebe gewonnen, welches mit FB-GM kultiviert wurde (siehe VI.1.3) ( $FB_{FP}$ ). Die zwei Reservoirs der HLM (Reihe 11 und 17) aus denen keine Zelllinie gewonnen werden konnten entstammten männlichen Patienten, ohne vom Durchschnitt abweichender Altersverteilung oder kardiopulmonaler Bypasszeit. Der Misserfolg der Zellisolation durch DG der Reihe 10 ist am ehesten auf einen Durchführungsfehler zurückzuführen (Umwucht der Zentrifuge bei ungleicher Beladung während der DG).

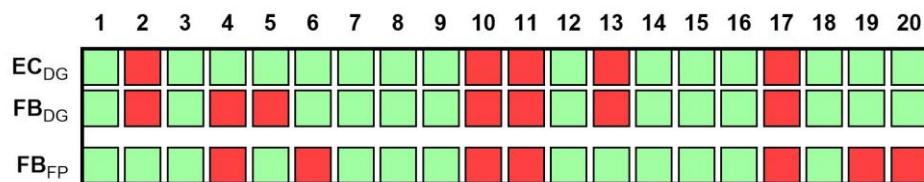


Abbildung 25: Isolationserfolg aus 20 Reservoiren der HLM nach Methode und Wachstumsmedium. Isolationserfolg (grün); es konnten keine Zellen isoliert werden (rot),  $EC_{DG}$ : Zellisolierung durch Dichtegradientenzentrifugation, Kultivierung in EC-GM,  $FB_{DG}$ : Zellisolierung durch Dichtegradientenzentrifugation, Kultivierung in FB-GM,  $FB_{FP}$ : Zellisolierung aus Filtern des Reservoirs und Kultivierung in Petrischale in FB-GM.

Bei den durch DG gewonnen Zellen konnte in der lichtmikroskopischen Evaluation der Zellkultur durchschnittlich 3-5 Tage nach Isolierung erstmals Zellwachstum beobachtet werden. Das Auswachsen der Zellen aus den Filterpapieren erfolgte etwa 1-2 Wochen später. Die  $EC_{DG}$  erreichten im Durchschnitt erstmals nach  $13,3 \pm 3,4$  Tagen Konfluenz. Ohne signifikanten Unterschied hierzu erfolgte die erste Passage der  $FB_{DG}$  im Schnitt nach  $16,3 \pm 5,8$  Tagen. Die  $FB_{FP}$  wurden, waren signifikant später konfluent. Eine erste Passage erfolgte nach durchschnittlich  $55,5 \pm 13,9$  Tagen.

Die Zellen, die durch die DG gewonnen wurden, konnten nach  $46 \pm 16$  Tagen in durchschnittlich  $10,2 \pm 1,8$  Kryoröhrchen eingefroren werden. Die Zellzählung vor der Kryokonservierung ergab einer ungefähren Zellzahl von  $22,7$  Mio.  $\pm 11,5$  Mio. ( $EC_{DG}$ ) beziehungsweise  $18,4$  Mio.  $\pm 14,3$  Mio. Zellen ( $FB_{DG}$ ). Nach durchschnittlich  $94 \pm 23$  Tagen wurden  $6,2 \pm 3,6$  Kryoröhrchen der  $FB_{FP}$  eingefroren. Die Zellzählung ergab dementsprechend  $8,9$  Mio.  $\pm 7,8$  Mio. Zellen.

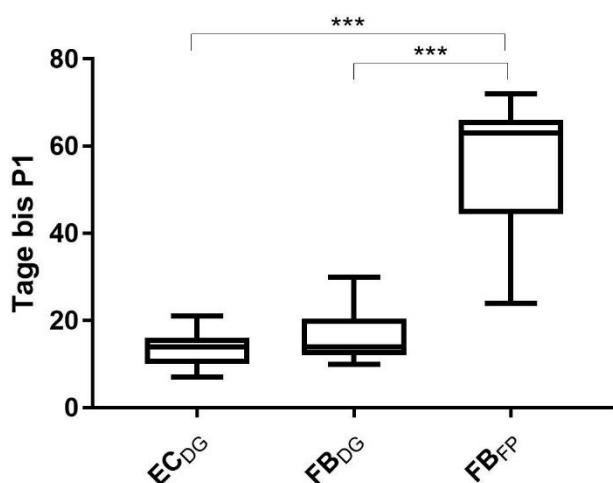


Abbildung 26: Tage bis zur ersten Passage in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsmedium und der Isolationsmethode,  $EC_{DG}$ : Zellisolation durch DG, Kultivierung in EC-GM,  $FB_{DG}$ : Zellisolation durch DG, Kultivierung in FB-GM,  $FB_{FP}$ : Zellisolation aus Filtern des Reservoirs, Kultivierung in Petrischale in FB-GM; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Bei der Kultivierung der  $EC_{DG}$  korrelierte ein längerer kardiopulmonaler Bypass mit einem längeren Zeitraum bis zur ersten Passage. Ansonsten war der Isolationserfolg, die Qualität der Zellen sowie die Anzahl der Tage bis zur Konfluenz der Zellen, respektive zur ersten Passage weder in direktem Zusammenhang zu der Dauer des kardiopulmonalen Bypasses während der Operation noch zum Alter oder Geschlecht der Patienten.

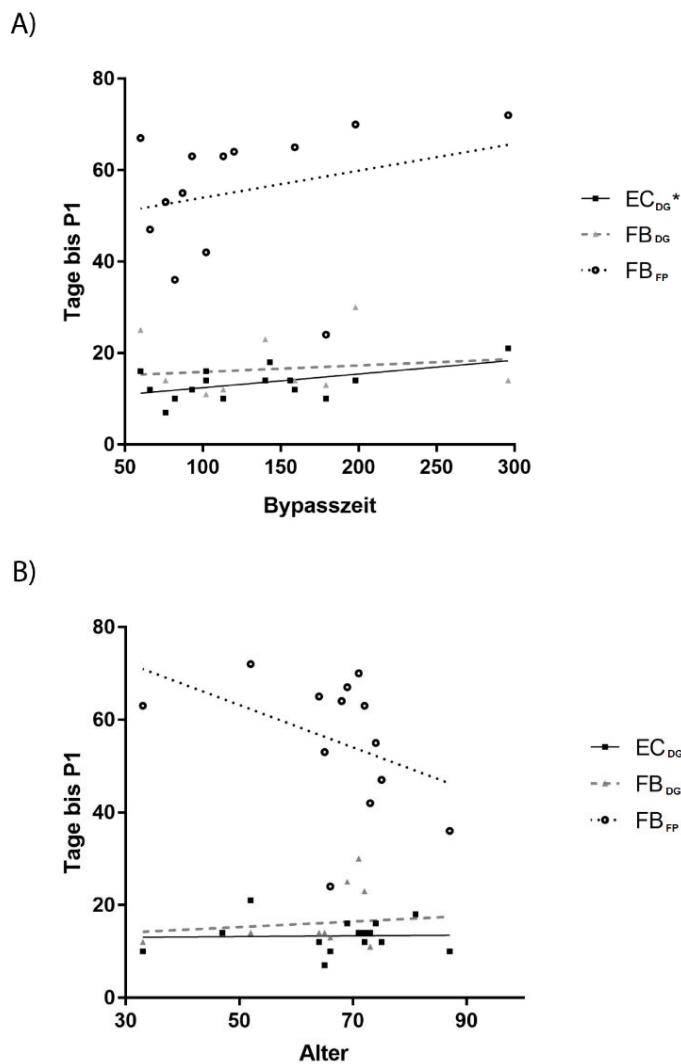


Abbildung 27: Die Anzahl der Tage bis zur Konfluenz der Zellen, respektive zur ersten Passage in Korrelation zur kardiopulmonalen Bypasszeit A) sowie zum Alter der Patienten B). Es besteht eine Korrelation der  $EC_{DG}$  zwischen verlängerter Bypasszeit mit einer zunehmenden Anzahl der Tage bis zur ersten Passage mit \*:  $p<0,05$ , kein Zusammenhang der sonstigen Variablen.

Morphologisch ließen sich im Lichtmikroskop verschiedene Zellformen unterscheiden. Es waren Zellen sichtbar, die eine endotheliale Morphologie zeigten: Bis zum Vorliegen von Konfluenz waren längliche Zellen mit strahlenförmig dünnen Ausläufern zu beobachten. Unter Konfluenz wurden kopfsteinpflasterartige Zellen, die als Monolayer adhärierten beobachtet (Abbildung 28).

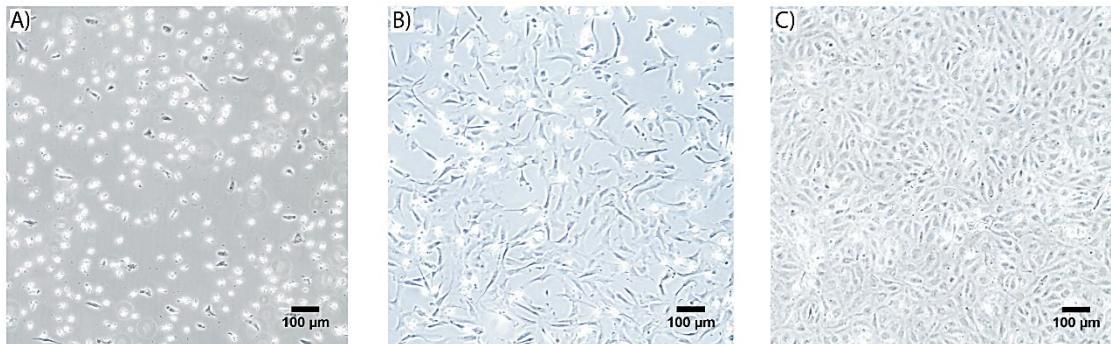


Abbildung 28: Beispielhafte Darstellung typischer Morphologie der EC im Lichtmikroskop. Aufnahme von EC<sub>DG</sub> am Tag 4-5 nach Isolierung (A), Aufnahme am Tag der Passage 1 (B) sowie bei vollständiger Konfluenz vor der Kryokonservierung (C). Maßstab Balken 100  $\mu$ m

Zudem fanden sich spindelförmige längliche Zellen, die unter Konfluenz mehrschichtig wuchsen. Dieses Wachstumsmuster ist für Fibroblasten bekannt (Abbildung 29).

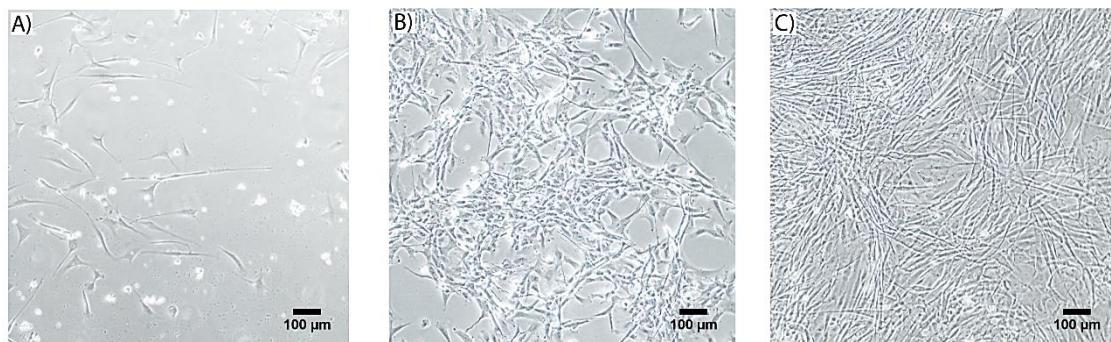


Abbildung 29: Beispielhafte Darstellung typischer Morphologie der FB im Lichtmikroskop. Aufnahme von FB<sub>DG</sub> am Tag 4-5 nach Isolierung (A), Aufnahme am Tag der Passage 1 (B) sowie bei vollständiger Konfluenz vor der Kryokonservierung (C). Maßstab Balken 100  $\mu$ m

Auch bei Kultivierung der Filter aus den Reservoiren der HLM in Petrischalen zeigte sich ein Wachstum langgestreckter Zellen entsprechend der typischen Morphologie von Fibroblastenkulturen (Abbildung 30).

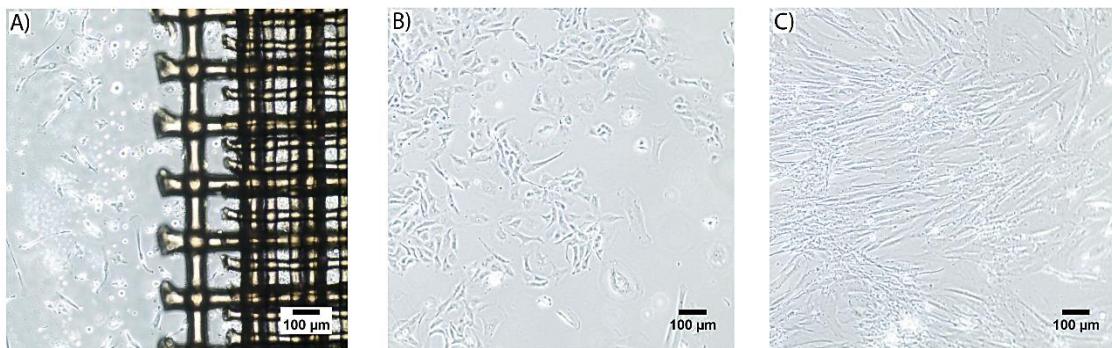


Abbildung 30: Beispielhafte Darstellung typischer Morphologie der FB nach Kultivierung der Filter aus den Reservoiren der HLM im Lichtmikroskop. Aufnahme von  $FB_{FP}$  am Tag 4-5 nach Isolierung (A), Aufnahme am Tag der Passage 1 (B) sowie bei vollständiger Konfluenz vor der Kryokonservierung (C). Maßstab Balken 100 µm

Etwa ein Drittel der Isolationen wiesen Kokulturen aus Zellen endothelialer und fibroblastenartiger Morphologie auf.

Schnell proliferierende Wachstumszentren mit beginnendem Zelluntergang im Zentrum der Wachstumszone im Sinne kolonieformender Einheiten waren in 13 Zellreihen zu sehen (Abbildung 31). Das Auftreten der kolonieformenden Einheiten stand in keinem Zusammenhang mit der Zellisolationsmethode oder dem verwendeten Wachstumsmedium. Diese Zellreihen ließen sich bei der Passage schwer trypsinieren und mussten zumeist per Zellschaber vom Kulturflaschenboden gelöst werden.

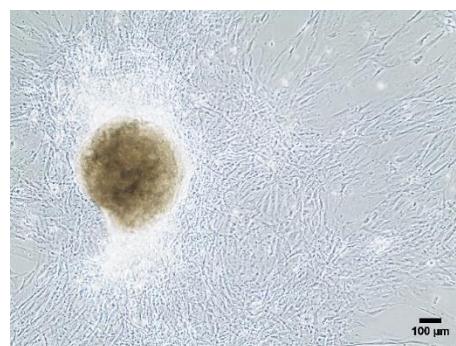


Abbildung 31: Darstellung eines schnell proliferierendes Wachstumszentrums in einer FB-Zellkultur unter dem Lichtmikroskop. Maßstab Balken 100 µm

### VII.3 WST-Viabilitätsbestimmung

Durch die WST-Viabilitätsbestimmung konnten die Proliferationsraten der Zellen mittels Substratumsatz pro Zeit bestimmt werden.

Die absoluten Messwerte wurden hierbei mit der Kontrollgruppe verglichen (Abbildung 32). Während sich bei der Messung der EC geringere absolute Dichtewerte im Vergleich zur Kontrolle zeigen, fallen bei den FB zu allen Zeitpunkten höhere optische Dichtewerte auf.

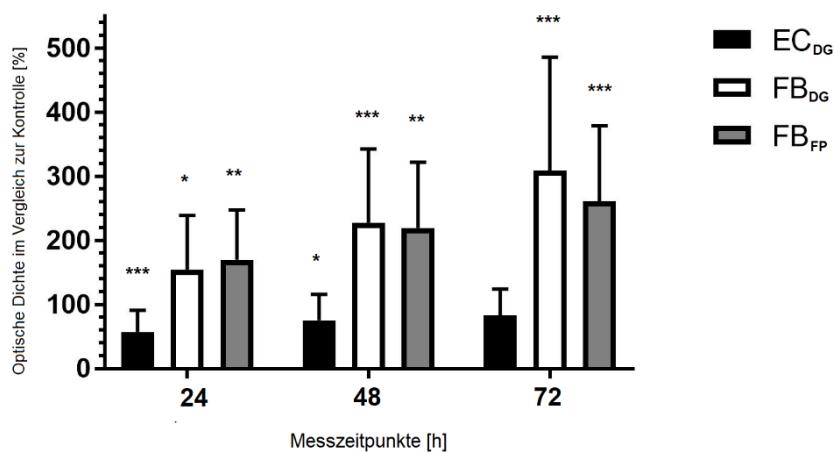


Abbildung 32: Absolute Messwerte der optischen Dichte der WST-Viabilitätsbestimmung im Vergleich zur Kontrolle (vaskuläre EC bzw. FB). Angaben in Prozent nach 24, 48 und 72h. Messbalken mit Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung. Signifikanz jeweils im Vergleich zu der Kontrolle. \*:  $p \leq 0.1$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0.001$ .

Die optische Dichte ist jedoch von der Anzahl vitaler Zellen abhängig. Zwar wurde die gleiche Anzahl an Zellen initial ausgesät, jedoch unterscheidet sich die Anzahl der Zellen, die nach 24 h adhärierten. Deshalb wurden zur Berechnung der Proliferationsrate die Werte der optischen Dichte nach 24 h als Referenzpunkt gesetzt und die Werte nach 48 h und 72 h auf diesen ersten Wert bezogen.

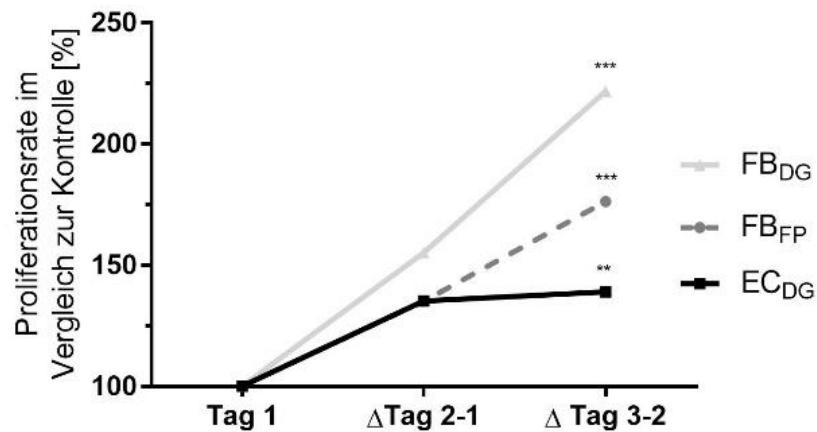


Abbildung 33: Proliferationsraten der Zellen im Vergleich zur Kontrolle (vaskuläre EC bzw. FB) am Tag 1, welcher als Referenzpunkt gewählt wurde, sowie der Differenz von Tag 2-1 und Tag 3-2, Angaben in Prozent. Signifikanz jeweils im Vergleich zu der Kontrolle. \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0.001$ .

Die Zellen, die aus den Reservoiren der HLM isoliert wurden, wiesen zu jedem Zeitpunkt signifikant höhere Wachstumsraten auf als die der vaskulär gewonnenen Kontrollzellen. Die Wachstumsraten unterschieden sich abhängig vom Wachstumsmedium. EC<sub>DG</sub> wiesen nach 24 h und 48 h 130 % höhere Proliferationsraten auf als die Proliferationsraten der Kontrollzellen. FB<sub>DG</sub> und FB<sub>FP</sub> zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 48 h 150 % höhere Proliferationsraten und nach 72 h 200 % höhere Raten. Eine höhere Viabilität korrelierte mit der Anwesenheit von kolonieformenden Einheiten in der Zellkultur. Es bestand keine Korrelation zwischen der Viabilität der Zellen mit Patientenalter, -geschlecht, Operationsdauer oder der Dauer des kardiopulmonalen Bypasses.

## VII.4 Immunzytologie

Charakteristische Expressionsmuster sind bei PECAM/CD31 und VE-Cadherin eine flächig zellwandständige bis in die Fortsätze betonte Anfärbung (Abbildung 34). Bei einer vWF-Färbung zeigt sich eine punktförmige perinukleäre Anfärbung. TE-7 färbt fleckig zentral im Zytosol an.  $\alpha$ -Aktin ist strangförmig die gesamte Zelle durchziehend, smooth muscle Myosin färbt perinukleär, Myosin heavy-chain ist strangförmig die Zelle durchziehend. [135]

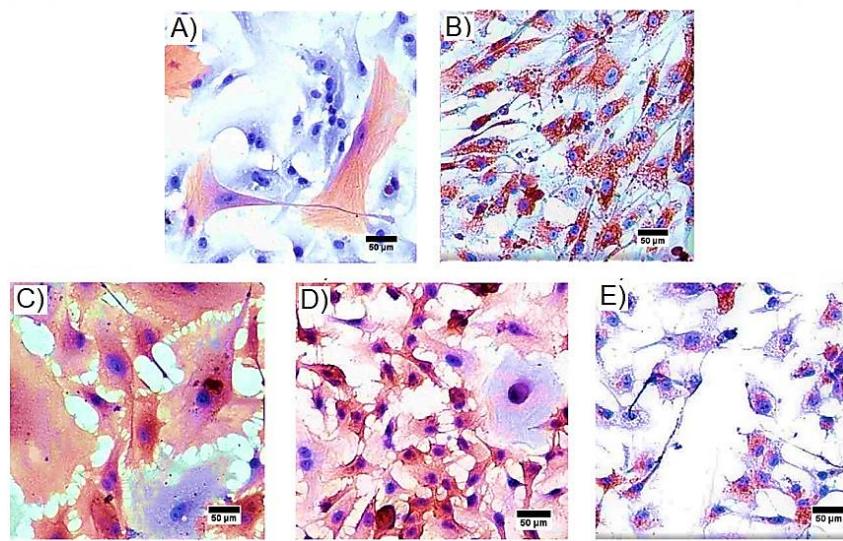


Abbildung 34: Charakteristische Expressionsmuster der verwendeten Marker in der Immunhistochemie, FB- Kultur:  $\alpha$ -Aktin (A), TE-7 (B) und EC-Kultur: PECAM (CD31) (C) VE-Cadherin (D), vWF (E). Maßstabbalken 50  $\mu$ m.

War mindestens einer der EC-Marker vWF, VE-Cadherin oder PECAM/CD31 positiv, so wurde die Kultur als Endothelzellkultur eingestuft. Der häufigste Nachweis eines EC-Markers gelang von PECAM/CD31.

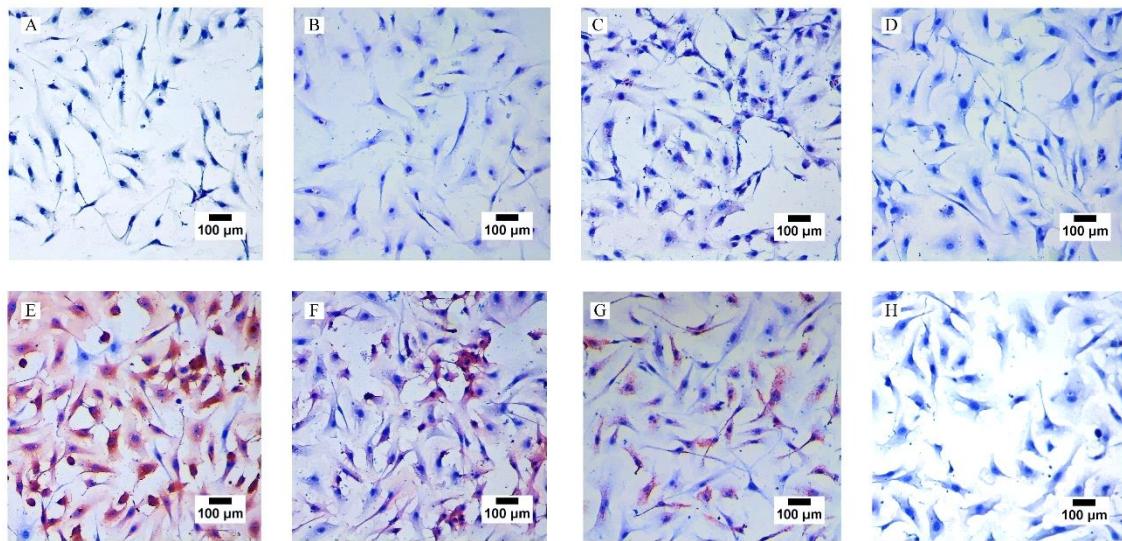


Abbildung 35: Beispielhafte EC-Kultur in der Immunhistochemie,  $\alpha$ -Aktin (A), Smooth muscle myosin (B), Myosin heavy chain (C), TE-7 (D), PECAM/CD31 (E), VE-Cadherin (F) und vWF (G), Negativkontrolle (H). Positive Marker sind die braun angefärbten Zellen der CD31/PECAM-, VE-Cadherin-, vWF-Färbung. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m.

War TE-7 positiv, wurde die Zelllinie als Fibroblasten-Kultur gewertet. Beispielhafte Ergebnisse der Anfärbung in der Immunhistochemie einer FB-Kultur sind in der folgenden Abbildung zu sehen (Abbildung 36).

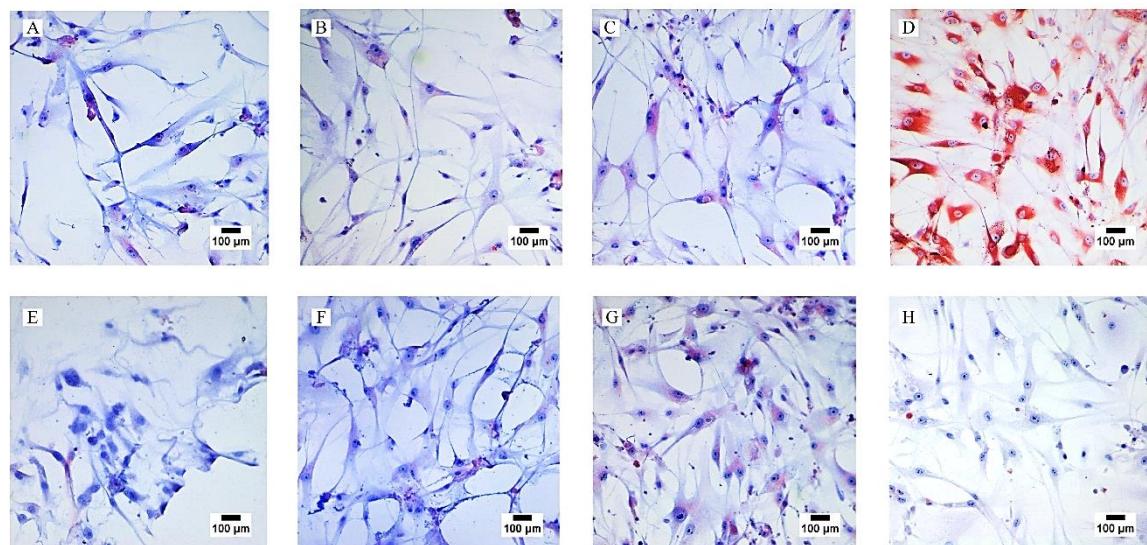


Abbildung 36: Beispielhafte FB-Kultur in der Immunhistochemie,  $\alpha$ -Aktin (A), Smooth muscle myosin (B), Myosin heavy chain (C), TE-7 (D), PECAM/CD31 (E), VE-Cadherin (F) und vWF (G), Negativkontrolle (H). Positive Marker sind die braun angefärbten Zellen der TE-7 Färbung. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m.

Fanden sich von beiden Zelltypen positive Marker, wurde die Kultur als Kokultur bewertet. Das Auftreten von Kokulturen korrelierte nicht mit der Isolationsmethodik oder dem verwendeten Wachstumsmedium.

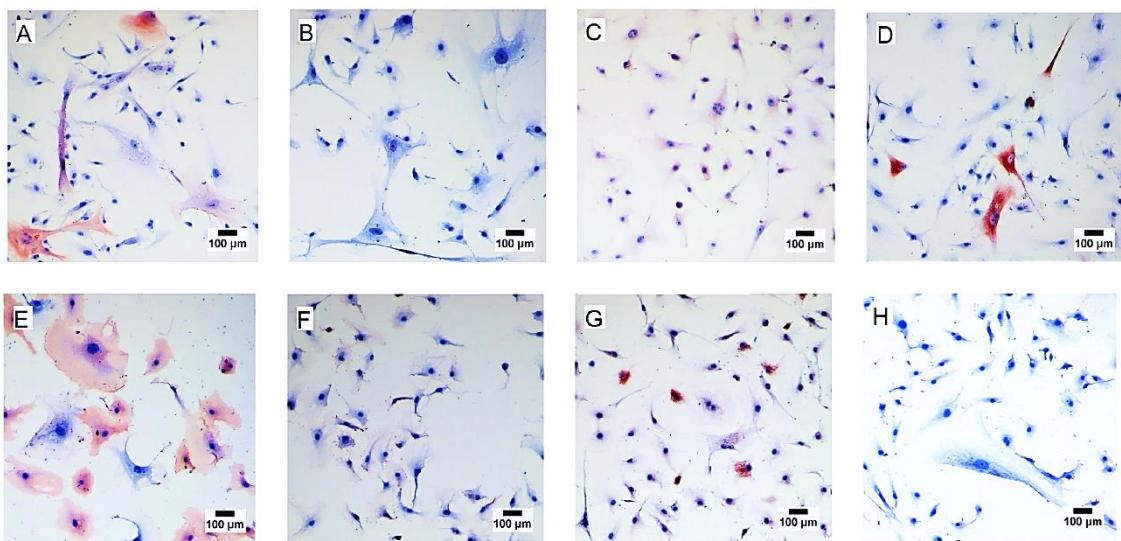


Abbildung 37: Beispielhafte Kokultur in der Immunhistochemie,  $\alpha$ -Aktin (A), Smooth muscle myosin (B), Myosin heavy chain (C), TE-7 (D), PECAM/CD31 (E), VE-Cadherin (F) und vWF (G), Negativkontrolle (H). Positive Marker sind die braun angefärbten Zellen der  $\alpha$ -Aktin, TE-7, PECAM und vWF-Färbung. Maßstab Balken 100  $\mu$ m.

Aktin färbte sich in nur wenigen Zellkulturen in vereinzelten Zellen positiv. SMC und Myosin heavy chain färbten sich nie deutlich positiv. Bestimmte Zellen ließen sich durch keinen der verwendeten Marker anfärbten.

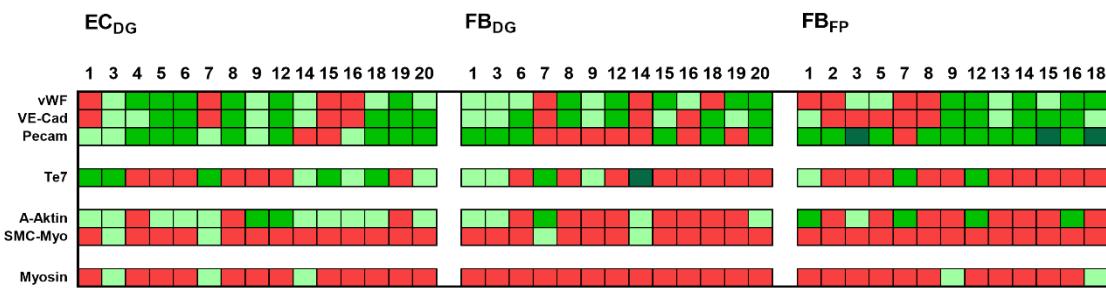


Abbildung 38: Ergebnisse der immunzytologischen Färbung. Darstellung der Zelllinien der 20 Reservoirs der HLM sortiert nach Isolationsform und Wachstumsmedium. Die Färbung wurde als negativ bewertet, wenn keine Markerexpression sichtbar war (rot). Eine positive Anfärbung konnte eine schwache Markerexpression bzw. nur vereinzelt angefärbte Zellen bedeuten (hellgrün), eine starke Markerexpression (mittelgrün) oder eine sehr starke Markerexpression, mit Anfärbung aller Zellen (dunkelgrün).

Zusammenfassend fanden sich 23 reine Endothelzellkulturen, vier reine Fibroblastenkulturen sowie 14 Kokulturen. Unter den Kokulturen bestanden 10 Kulturen überwiegend aus EC, bei vier Zelllinien herrschten Fibroblasten vor (Abbildung 39).

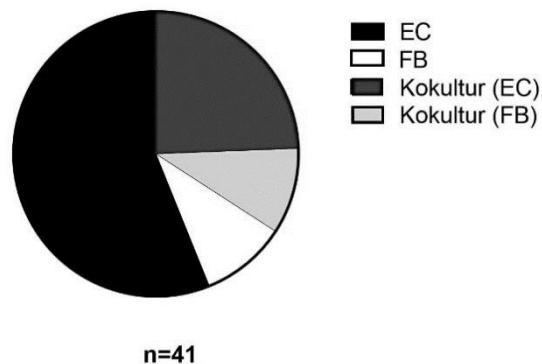


Abbildung 39: Verteilung der Zelltypen: 23 EC-Zelllinien, 4 FB-Zelllinien, 10 Kokulturen mit primär EC, 4 Kokulturen mit primär FB

In 10 von 17 Zellreihen (aus 20 HLM) gelang eine Isolation von sowohl EC als auch FB. In den restlichen 7 Zellreihen befanden sich ausschließlich EC.

## VII.5 Immunfluoreszenz

Anhand der Immunfluoreszenzfärbung mit den Stammzellmarkern CD45, CD73, CD90 und CD105 konnten keine mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden. Alle Färbungen dieser Marker waren negativ bei positiver DAPI-Färbung. Zum Vergleich diente eine Negativkontrolle. Auch bei längerer Inkubationszeit der primären Antikörper über Nacht konnte kein Nachweis erfolgen.

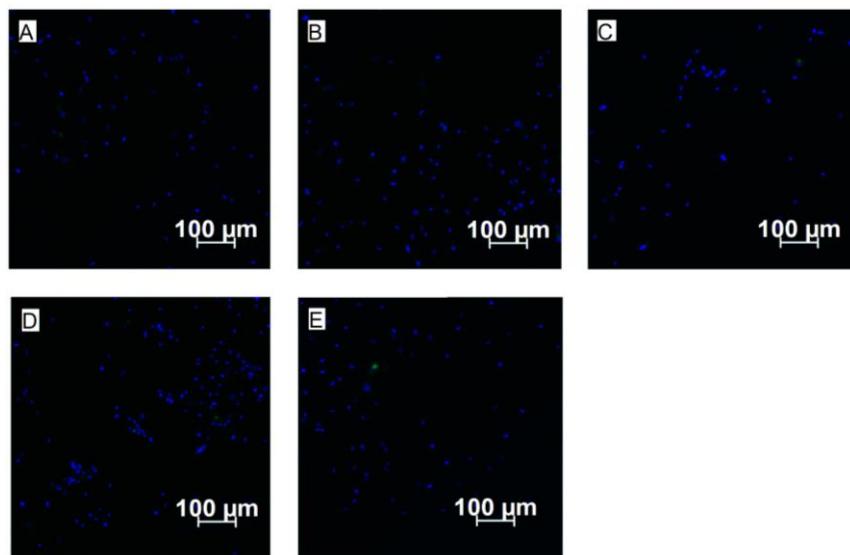


Abbildung 40: Immunfluoreszenzfärbung mit den Stammzellmarkern CD73 (A), CD90 (B), CD105 (C), CD45 (D), Negativkontrolle (E); Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Kein Stammzellmarker färbte positiv an (grün), Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ .

## VII.6 Kultivierung unter Fluss

Bei allen 15 Endothelzellreihen, welche unter Fluss kultiviert wurden, fanden sich nach 24 h Flusskultivierung adhärierte Zellen in den Kanalobjektträgern. Alle Zellreihen färbten sich positiv auf den EC-Marker VE-Cadherin sowie den Zytoskelett-Marker F-Aktin und Zellkernmarker DAPI und konnten so in die Analyse miteingeschlossen werden.

Die Immunfluoreszenzfärbung auf VE-Cadherin ließ Rückschlüsse auf die Entwicklung der Zell-Zell-Kontakte, Konfluenz der Zellen und Formation eines Monolayers nach Kultivierung unter Fluss zu. In Kombination mit der F-Aktin Färbung zeigte sich eine Ausrichtung in Flussrichtung.

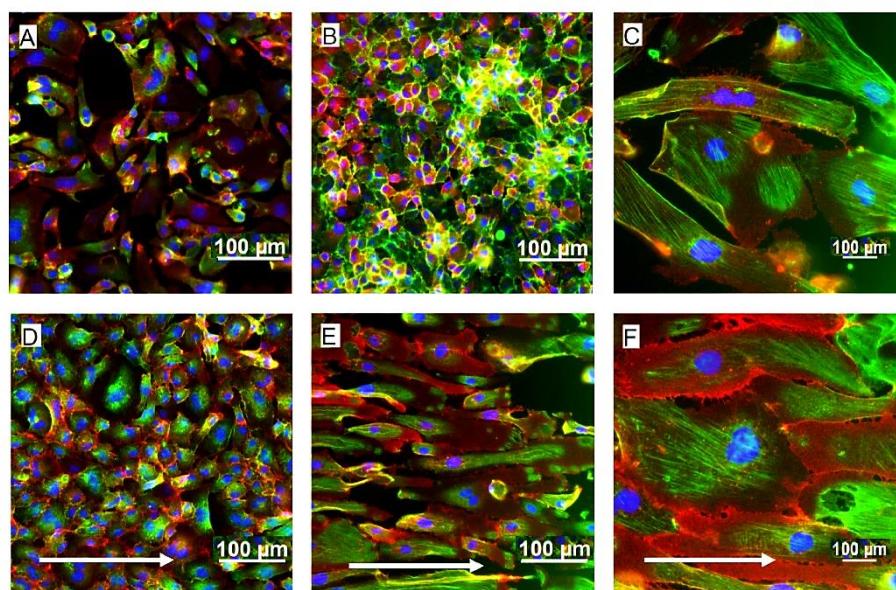


Abbildung 41: Visuelle Auswertung der Immunfluoreszenzbilder nach 24h Flussversuch, Pfeil in Flussrichtung. In der statischen Kontrolle wurde keine Konfluenz des Zellteppichs erreicht (A). Unter Fluss zeigt sich eine vollständige Konfluenz (D). Unter statischen Bedingungen zeigt sich kein Monolayer (B), unter Fluss bildet sich ein Monolayer (E). Das Aktin richtet sich in der statischen Bedingung nicht parallel an (C), unter Fluss sind die Aktinbündel parallel ausgerichtet (F). F-Aktin (grün), VE-Cadherin (rot), DAPI (blau), Maßstabsbalken 100μm

Die Zellkerne wurden in der Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI gegengefärbt. Durch eine Zählung der Zellkerne konnte auf Proliferationsraten nach Flusskultivierung im Vergleich zu der statischen Kontrolle rückgeschlossen werden.

Nach visueller Auswertung wiesen 11 von 15 EC-Zellreihen nach 24 h Fluss Konfluenz auf, wohingegen bei der statischen Kontrolle 8 Zellreihen konfluent waren.

Bei 13 Zellreihen war nach 24 h Kultivierung unter Fluss ein Monolayer der Zellen zu beobachten, ebenso bei 4 Zellreihen der statischen Kontrolle, in den übrigen Zelllinien

bildeten sich mehrschichtige Zellformationen. Die Ausrichtung des Aktins in paralleler Richtung ließ sich bei 11 Zellreihen nach Fluss sowie bei 6 Zellreihen der Kontrolle nachweisen.

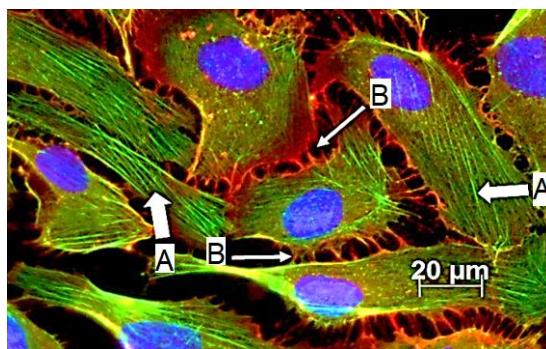


Abbildung 42: Immunfluoreszenzaufnahme nach 24h Flusskultivierung; Das Zytoskelett ist durch die Anfärbung von F-Aktin (A), in grün) dargestellt. Die Zell-Zell-Kontakte wurden durch VE-Cadherin gefärbt (B), in rot), die Zellkerne wurden mit der DAPI-Kernfärbung in blau gefärbt.

Die Ausrichtung der gesamten Zellen in Flussrichtung war ausschließlich in 9 Zellreihen nach Kultivierung unter Fluss zu beobachten (Abbildung 43).

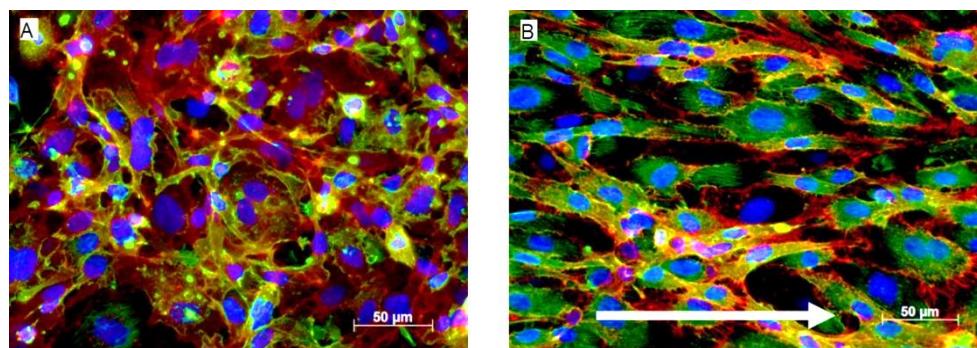


Abbildung 42: Immunfluoreszenz A: statische Kontrolle, B: nach 24h Flussversuch: Ausrichtung der Zellen in Flussrichtung (Pfeil), Ausrichtung des Aktins parallel der Flussrichtung, vermehrte Expression von VE-Cadherin; F-Aktin (grün), VE-Cadherin (rot), DAPI (blau)

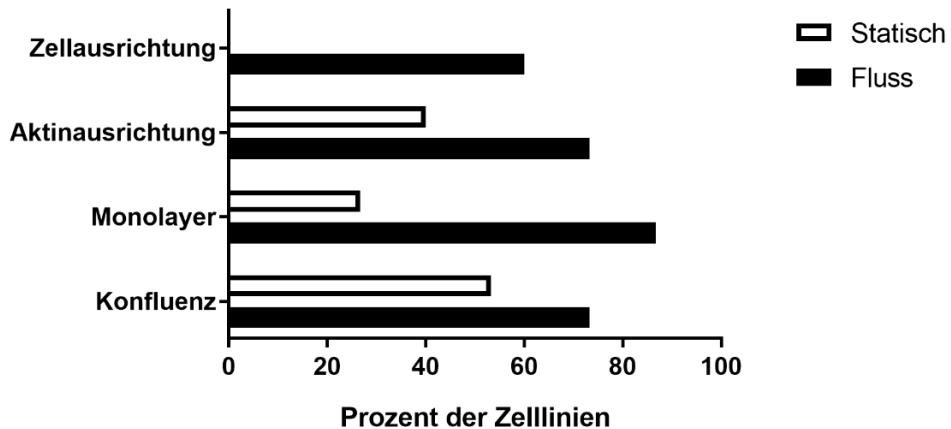


Abbildung 43: Anteil aller Zelllinien, welche eine positive Veränderungen nach 24h Kultivierung unter Fluss oder nach Kultivierung unter statischen Bedingungen aufweisen. Zellausrichtung parallel zur Flussrichtung, Anordnung von Aktin in parallelen Strängen, Monolayerausbildung und Konfluenz des Zellteppichs. Flusskultivierung n=15, statische Kontrolle n=15.

Nach Ausschluss der nicht konfluenten Zellreihen wurden in der Proliferationsbestimmung 12 Zellreihen nach Fluss mit ihrer statischen Kontrolle verglichen. In 7 Zellreihen fanden sich nach 24 h Fluss mehr Zellen als in der Kontrolle. Prozentual war die Proliferationsrate nach Flusskultivierung um  $126,3 \pm 42\%$  signifikant erhöht.

Die Auswertung der Quantifizierung der Zell-Zell-Kontakte nach Flusskultivierung im Vergleich zur statischen Kontrolle ergab eine signifikante Zunahme des mittleren Grauwerts um  $133,4 \pm 42,4\%$ . Insgesamt war bei 12 der 15 Zellreihen der mittlere Grauwert nach Fluss höher als bei der statischen Kontrolle und wies demnach auf eine vermehrte Fluoreszenz des VE-Cadherin-Markers hin.

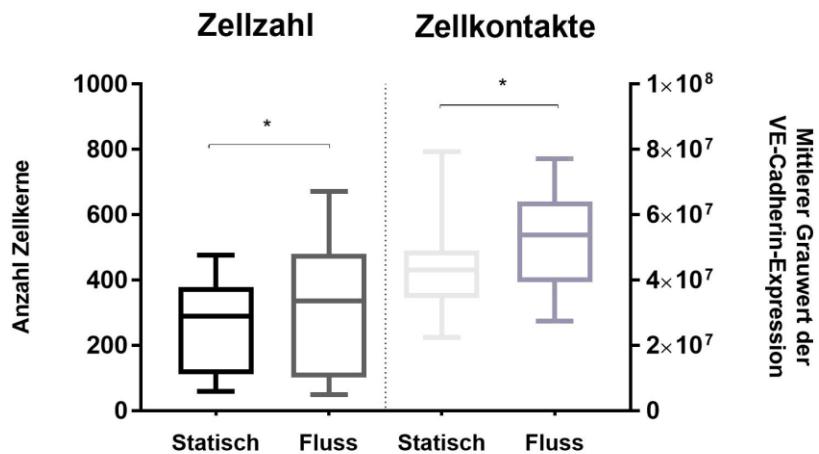


Abbildung 44: Darstellung der Veränderungen der Zellzahl und der Zellkontakte nach 24h Flussversuch im Vergleich zur statischen Kontrolle; Die Messung der Zellkerne pro Sichtfeld ist auf der linken X-Achse aufgetragen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kultivierung unter Fluss und der statischen Kontrolle. Die Bestimmung der Zell-Kontakte erfolgte anhand der Quantifizierung des mittleren Grauwertes der VE-Cadherin-Expression, auch hier findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen \*:  $p \leq 0.05$ .

## VIII. Diskussion

Das TE von Herzklappen rückt, durch eine stete Zunahme der herzklappenssozialierten Erkrankungen und das Fehlen einer optimalen Prothese zum Herzklappenersatz, als Lösungsansatz zunehmend in den Vordergrund. Auf der Suche nach einer geeigneten Zellquelle für die Besiedelung von Scaffolds wurden in dieser Arbeitsgruppe erstmals erfolgreich Zellen postoperativ aus der HLM gewonnen [100].

### Isolationserfolg

Ziel der Arbeit war die Etablierung einer zuverlässigen Zellquelle, welche eine schnelle Zellvermehrung gewährleistet, um zu einer möglichst kostengünstige TE Herzklappe zu ermöglichen. Die gewonnen Zellen sollten mindestens gleichwertig, optimalerweise jedoch den bisher im TE verwendeten Zellen überlegen sein.

Wir konnten aus 17 der 20 Reservoirs der HLM erfolgreich postoperativ Zellen gewinnen. Diese Methodik der Zellisolation ist somit als zuverlässig zu werten. Die Gewinnung der Zellen durch DG zeigte sich gegenüber der Zellgewinnung direkt aus den Filterpapieren als überlegen. Zwar waren die Isolationserfolge vergleichbar, die Methodik der DG wies jedoch eine schnellere Zellvermehrung auf, welche sowohl in der Zellkultur wie auch in der WST-Viabilitätsmessung beobachtet werden konnte. Die zeitnahe Herzklappenimplantation ist für die Gesundheit des Patienten zum Teil lebensnotwendig. Lange Kultivierungszeiten im Labor sind mit einer Zunahme an logistischem und finanziellem Aufwand verbunden. Aus diesen Gründen ist die schnellere Methodik der DG zur Zellisolation für den Einsatz in der klinischen Routine besser geeignet [139]. Für eine TEHV werden je nach Ansatz etwa 1,5 Mio. Zellen pro  $\text{cm}^2$  benötigt, dies entspricht bei einer Herzklappenoberfläche von 60  $\text{cm}^2$  einer zu erreichenden Zellzahl von etwa 90 Mio. Zellen. Hierfür ist eine maximale Zellausbeute erforderlich [140]. Zur schnelleren Erreichung dieser Zellzahl ist eine effiziente Isolierung und anschließende Kultivierung sowie ein maximales Angebot der gesuchten Zellen im Wirt anzustreben. Patienten, die einen Klappenersatz benötigen, weisen häufig multiple Merkmale auf, welche die Zahl der zirkulierenden EC im peripheren Blut erhöhen können. So kann bei jenen Patienten eine erhöhte Zellausbeute erwartet werden. Zum einen sind aufgrund der Grunderkrankung von Patienten, welche einen Herzklappenersatz benötigen höhere CEC Werte im Blut zu beobachten. So sind beispielsweise bei Patienten mit Aortenklappenstenosen höhere EPC Werte als in Kontrollgruppen im Blut zu finden [141]. Zum anderen finden sich zusätzlich durch

Komorbiditäten höhere CEC Werte als in Kontrollgruppen. Herzklappenerkrankungen sind eine Erkrankung des fortgeschrittenen Alters [22]. Im Alter häufige Komorbiditäten sind Atherosklerose, Diabetes mellitus Typ II, arterielle Hypertonie, Nikotin-Abusus und Hyperlipoproteinämie. All diese Erkrankungen führen zu einer hohen EPC Zahl im Blut [103].

Um eine maximale Ausbeute an EPC zu erreichen, wurde in Studien die erfolgreiche Induktion einer Mobilisierung von EPC mit G-CSF beschrieben [142, 143]. Juthier et al beschrieben jedoch, dass dezellularisierte Aortenklappen vom Schwein, welche in Lämmer implantiert wurden, schneller degenerierten, wenn die Lämmer zuvor mit G-CSF behandelt wurden, um eine Zellmobilisierung und somit die Zellbesiedelung in vivo anzustoßen. Nach G-CSF Behandlung wurde in den implantierten Herzklappenprothesen eine erhöhten Entzündungsreaktion mit Infiltration von Entzündungszellen und konsekutiver Kalzifikation, sowie Schrumpfen und Verdickung der Klappen beobachtet. [64] Zudem kann ein medikamentöses Eingreifen mit zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen verbunden sein.

Die Einnahme bestimmter Medikamente zur Optimierung des Isolationserfolges für kardiovaskuläres TE könnte diskutiert werden, wenn eine weitere therapeutische Indikation besteht. So kommt es durch Antihypertensiva, antianginöse Therapeutika, Lipidsenker, Thrombozytenaggregationshemmer und viele weitere Medikamente zu einer vermehrten Mobilisierung von EPC, einer erhöhten Ausschüttung ins periphere Blut, verbesserte Proliferation, Differenzierung, Migration und Homing. [144]

Ein Maximum an EPC und CEC wird zudem etwa 6 h nach Operation mit HLM oder auch nach anderen Traumata erreicht, so dass eine Blutentnahme mit Zellisolierung zu diesem Zeitpunkt zusätzlich zu der postoperativen Zellisolierung aus den Reservoirn der HLM denkbar wäre [118].

Dass EPC sich für das TE von Herzklappen besonders gut eignen, konnte in Studien bewiesen werden. So ist beispielsweise die Immunreaktion des Körpers auf EPC geringer als auf vaskuläre EC [145].

## **Zellkultur**

3-5 Tage nach Isolation wurden in den Zellkulturflaschen erstmals auswachsende Zellen beobachtet, diese wurden durchschnittlich einen Monat nach Isolation erstmals passagiert. Zwei Zelltypen konnten primär beobachtet werden: Spindelförmige langgestreckte Zellen sowie pflastersteinartige Zellteppiche. Diese Zellmorphologien entsprachen den EC und FB, die wir in unserem Labor aus der Vena saphena magna

isolieren. Zellen, die wenige Tage nach Isolation aus der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes wachsen, sind abgelöste Zellen des Endothels, die reifen CEC. Schnell proliferierendes Zellwachstum nach etwa einem Monat ist auf Zellen aus dem Knochenmark, die EPC, zurückzuführen. [146] Die in mindestens 13 Zelllinien beschriebenen schnell proliferierenden Wachstumszonen sind als kolonieformende Einheiten als typisches Merkmal der EPC vorbeschrieben [147].

Die Existenz der EPC spiegelt sich auch in den höheren Proliferationsraten der isolierten Zellen wider [122]. Die Zellen, die aus den HLM isoliert wurden, sind in der WST-Viabilitätsmessung zu allen Zeitpunkten signifikant höher proliferativ als die der Kontrollgruppe. In FB-GM kultivierte Zellen sind unabhängig von der Isolationsmethode höher proliferativ als in EC-GM kultivierte Zellen [148].

### **Immunzytologie**

Für das TE von Herzklappen werden FB und EC benötigt. Das Ziel der Arbeit war die erfolgreiche Isolation beider Zelltypen aus einer HLM. Für eine zuverlässige Evaluation und Weiterverwendung der Zellen sollte die Reinheit der Kulturen möglichst hoch sein. Durch die Immunhistochemie konnte eine Differenzierung der Zellen in EC und FB erfolgen. Insgesamt wurden 23 Zelllinien reine EC-Kulturen, 4 reine FB-Kulturen und 14 Kokulturen beobachtet. Der Endothelzellmarker CD31 wurde in der immunhistochemischen Färbung von EC häufiger oder stärker positiv angefärbt als die EC-Marker vWF oder VE-Cadherin. Dies ist für EC der kolonieformenden Einheiten vorbeschrieben [122]. Wie bereits in der Zellkultur lichtmikroskopisch beobachtet, konnten in der Immunhistochemie Kokulturen bestätigt werden. Unabhängig von der Isolationsmethodik und dem Wachstumsmedium färbten sich in mindestens 14 Zelllinien einzelne Zellen mit EC-, andere mit FB-Markern. Gewisse Zellmorphologien ließen sich hingegen mit keinem der verwendeten Marker färben, ihre Zellherkunft bleibt unklar. Kokulturen bei Zellisolation aus der mononukleären Zellfraktion aus dem peripheren Blut sind vorbeschrieben [149]. Ursache hierfür ist, dass bei der Isolation durch DG die Zellen nach Gewicht aufgetrennt werden. Da aber das Gewicht der Zellen und somit der Sedimentationskoeffizient in einem sehr engen Bereich liegen, werden nicht benötigte Zellen nicht suffizient aussortiert. Um spezifischere Zellkulturen zu erhalten sind Änderungen an der Isolationsmethode sowie eine veränderte Kultivierung denkbar. Woywodt et. al. beschrieben alternative Methoden zur Erreichung einer höheren Reinheit der Zellkultur, bei denen EPC über ein magnetisches Zellselektionssystem gewonnen wurden. Dabei werden die EPC oder andere Zellen mit paramagnetischen spezifischen

Antikörpern gekoppelt an magnetische Partikel gebunden und so aus der Zellfraktion gefiltert. So können sie als reine Zellkultur weiterverarbeitet werden [150]. Diese Methodik ist jedoch besonders bei großen Zellzahlen deutlich teurer als die DG und daher für die klinische Anwendung weniger geeignet. Es bliebe auch fraglich, ob diese Zellen für eine TEHV zugelassen werden würden. Um die in der mononukleären Zellfraktion enthaltenen Zellen aufzutrennen, ist eine spezifischere Kultivierung der gesuchten Zellen notwendig, unter der die nicht gesuchten Zellen durch Apoptose zugrunde gehen. So besteht beispielsweise das für die Zellkultur häufig verwendete FCS als Nährmedium aus einer schlecht zu kontrollierenden und je nach Charge variierenden Zusammensetzung aus unspezifischen Wachstumsfaktoren [151]. Auch wäre FCS, da es von Kälbern gewonnen wird, für die Zulassung zum klinischen Einsatz im TE als kritisch zu betrachten. Eine individuelle Anpassung und zellspezifische Zusammensetzung des Wachstumsmediums könnten eine bessere Induktion, Zelldifferenzierung und dadurch Purifikation und Förderung eines spezifischen Phänotyps sowie eine effiziente Proliferation von ECs fördern [152].

Kontraktile Proteine wie  $\alpha$ -Aktin und SMC wurden in der Immunhistochemie vereinzelt in den gewonnenen Zellen nachgewiesen. Die Präsenz der kontraktilen Proteine weist auf das Vorhandensein von Myofibroblasten hin. Diese stellen aktivierte Fibroblasten dar, welche die ECM produzieren und für das Remodeling der Klappe verantwortlich sind [153]. Ihr Anteil an allen Fibroblasten variiert *in vivo* [54]. Physiologisch ist der Anteil an aktiven Myofibroblasten in fetalen Herzklappen am höchsten und nimmt im Alter ab [52]. Ein ausgewogener Anteil ist essenziell für die lange Klappenhaltbarkeit. Bei implantierten TEHV mit einem hohen Anteil an Myofibroblasten konnte eine überschießende ECM-Produktion mit konsekutiver Fibrose, Verdickung und Versteifung der Klappen beobachtet werden [154]. *In vitro* kann der Anteil der Myofibroblasten an allen Fibroblasten gezielt gesteuert werden. Wird beispielsweise eine physiologische Gewebeelastizität der Herzklappen ( $\sim 7$  kPa) *in vitro* nachgeahmt, kommt es zu einem geringeren Myofibroblastenanteil als auf hartem, weniger elastischem Zellkulturboden ( $\sim 32$  kPa) [53].

Es ergab sich keine Anfärbung des herzmuskelspezifischen Antikörpers myosin heavy chain in der immunhistologischen Färbung. Eine Typisierung aller Zellen im Anschluss an die Isolation sollte in folgenden Studien untersucht werden und könnte die Versuchsplanung optimieren.

In 7 von 17 Zellreihen gelang der Nachweis von EC ohne die Isolierung von FB. Da für das TE von Herzklappen beide Zelltypen benötigt werden, ist für die praktische Anwendung eine vermehrte FB-Gewinnung nötig. Alternative Methoden autologe FB zu isolieren wurden beschrieben. Beispielsweise gelingt eine wenig invasive Isolation von Fibroblasten von der Haut. Auch deren Eignung im TE von Herzklappen konnte bereits demonstriert werden. [74, 155]

In einer Studie, welche die Isolation von EPC aus Blut einer ECMO bei Kindern beschreibt, wurden per Zufall MSC isoliert [119]. Da in der Immunhistologie in mehreren Zelllinien ungefärbte Zellen aufgefallen waren, erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung auf MSC-Marker. Hierdurch konnte kein Nachweis von MSC erbracht werden. Da die Isolation auch aus dem peripheren Blut vorbeschrieben ist und die Eignung der MSC für das TE bereits untersucht wurde, wäre als weiterführendes Forschungsthema die gezielte Isolation dieser Zellen postoperativ aus der HLM zu untersuchen. So können MSC auch zu EC ausdifferenzieren. Stammzellen bieten ein hohes Proliferationspotential und pluripotente Stammzellen bieten ein unbeschränktes Differenzierungspotential. Durch die hohe Proliferationsrate besteht jedoch die Gefahr des exzessiven Wachstums bis hin zur Entartung und Tumorformation. Zudem ergeben sich durch das pluripotente Differenzierungspotential der Stammzellen neue ethische Hürden [156-159].

### **Flusskultivierung**

Insbesondere sollte in der vorliegenden Arbeit die Eignung der gewonnenen Zellen für das TE von Herzklappen und deren Einsatz zur Implantation in den Patienten evaluiert werden. Hier spielt die Scherspannung, welcher die Zellen *in vivo* ausgesetzt sind eine entscheidende Rolle.

Nach Kultivierung der EC über 24 h unter Fluss hielten alle Zelllinien der Scherspannung stand. Die Proliferationsrate nahm im Gegensatz zu der statischen Kontrolle signifikant bis zur Ausbildung eines Monolayers zu. Eine signifikant erhöhte Expression der interzellulären Verbindungen, welche durch VE-Cadherin visualisiert wurden, konnte beobachtet werden [160, 161]. Scherspannung bewirkt durch veränderte Genexpression der Zelle eine Veränderung des Phänotyps. Eigenschaften, welche *in vivo* notwendig sind, werden so vermehrt exprimiert. Bei EPC induziert Scherspannung die Integration in den Zellverband und die Differenzierung zu reifen EC und fördert einen antithrombotisch, antisklerotischen Phänotyp [161]. Um die optimale Zelle für das TE von Herzklappen zu finden, wäre deshalb eine dauerhafte Kultivierung unter Scherspannung erfolgsversprechend.

In 60% der Zellreihen zeigten die Zellen nach 24 h Kultivierung unter Fluss eine Ausrichtung der Längsachse und des Zytoskeletts parallel zur Flussrichtung. 40% der Zellreihen zeigten jedoch keine Ausrichtung parallel zur Flussrichtung. Unter der Annahme, dass die gewonnenen EC-Kulturen aus dem HLM Reservoir aus reifen CEC wie auch EPC bestanden, existieren in den untersuchten Zellkulturen unterschiedliche Phänotypen an EC. Diese genetischen Unterschiede regulieren auch das Verhalten der unterschiedlichen EC unter Scherspannung. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass vaskuläre EC (reife CEC) sich unter Fluss parallel zur Flussrichtung ausrichten. Hingegen liegen EPC, gleich wie EC, welche von Stammzellen gewonnen werden, senkrecht zum Fluss [162, 163]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass auch valvuläre EC sich unter Scherspannung nicht parallel, sondern senkrecht zum Fluss ausrichten [51, 164]. Diese Unterschiede in den Eigenschaften der EC sollten im TE von Herzklappen beachtet und aktiv genutzt werden. EC, welche aus Stammzellen gewonnen werden, ähneln in ihrem Phänotyp am meisten valvulären EC und sind deshalb für das TE von Herzklappen sehr gut geeignet [162]. Blancas et al. statuieren, dass auch EPC dem Phänotyp der valvulären EC sehr ähnlich seien [163].

## IX. Resümee und Ausblick

In der Zusammenschau der Ergebnisse kann festgestellt werden, dass die Isolierung von Zellen postoperativ aus der HLM erfolgreich gelang und für den klinischen Gebrauch zuverlässig möglich ist. Die Methodik der Isolation war mit 3-5 h vergleichsweise schnell und kostengünstig. Wenn auch die Herstellung einer TEHV teurer ist als die der mechanischen Herz- oder Bioklappen, müssen die wegfallenden Folgekosten dieser Klappen für lebenslange Antikoagulation und Reoperationen in die Kalkulationen der Gesamtbilanz einbezogen werden. Unter der Bedingung, dass eine Operation an der HLM zwingend notwendig ist und die Implantation der TEHV hierzu zeitversetzt erfolgen kann, eignet sich die HLM als Zellquelle für das TE von Herzklappen hervorragend. Sie bietet unkomplizierten Zugang zu großen Mengen an Blut und Gewebepartikeln im Filter. Die ethischen Hürden, diese weiterzuverarbeiten, sind gering, da die Reservoir der HLM mit den Zell- und Blutrückständen postoperativ entsorgt werden. Zudem entfallen die Risiken einer invasiven Isolationsmethode wie beispielsweise der Isolation von FB aus der Haut. Da der Einsatz von TEHV mit Wachstums- und Remodelingpotenzial besonders für Kinder zur Vermeidung von risikobehafteten Re-Operationen gedacht ist, stellt sich die Frage nach einer nicht zusätzlich invasiven und komplikationsfreien Zellquelle. Versuche, pränatal Zellen aus der Amnionflüssigkeit zu isolieren, sind mit Schwangerschaftsrisiken behaftet [73]. Alternative Zellquellen sind Nabelschnurgewebe oder Blut [72, 165]. Besonders für komplexe Herzfehler, die mehrzeitige Operationen erfordern, wie die Fontan-Operation, ist die Isolation aus der HLM zu empfehlen [166]. Der Isolationserfolg von Zellen postoperativ aus der HLM muss bei Kindern in Studien jedoch noch separat geprüft werden.

Die gewonnenen Zellen ließen sich aufgrund der hohen Proliferationsfähigkeit schnell potenzieren. Nicht zuletzt waren die gewonnenen EC den Merkmalen der valvulären EC ähnlich und scheinen deswegen für einen Einsatz im TE von Herzklappen sehr gut geeignet.

In zukünftigen Versuchen muss die Eignung der Zellen überprüft werden, wenn diese auf Scaffolds ausgesät und im Bioreaktor konditioniert werden.

Für die Anwendung in der Praxis wird sich zudem die Frage nach einer langfristigen Lagerungstechnik der fertigen TEHV oder der Zellen stellen. So dass nach jeglichem Eingriff an der HLM, vergleichbar mit der Nabelschnurbluteinlagerung postpartal, postoperativ prophylaktisch Zellen isoliert und bei Bedarf aus den gewonnenen Zellen Herzklappen hergestellt werden könnten.

## X. Zusammenfassung

Um den Nachteilen der herkömmlichen biologischen und mechanischen Klappenprothesen zu begegnen, TEHV, welche ein Wachstums-, Anpassungs- und Reparationspotenzial besitzen. Trotz laufender Fortschritte im TE von Herzklappen konnte noch keine optimale Zellquelle gefunden werden. Zusammenfassend ließ sich in dieser Arbeit eine Methodik etablieren, welche es erlaubt zuverlässig aus HLM postoperativ Zellen zu gewinnen. Eine erfolgreiche Isolierung von Zellen war in 17 von 20 Versuchen möglich. Aus den drei Isolationsmethoden je 20 HLM entstanden 41 Zelllinien, welche auf ihre Eignung im TE getestet werden konnten.

Als überlegene Isolationsmethodik stellte sich die DG von Blut und den hierin ausgewaschenen Filtern der HLM dar. Die isolierten EC und FB zeigten eine höhere Proliferationsrate als die Kontrollgruppe der vaskulären Zellen, welche aktuell häufig im TE von Herzklappen verwendet werden. In der Untersuchung der Zelllinien zeigte sich mittels Immunhistochemie eine höhere Rate an EC-Zelllinien mit 23 EC-Zelllinien, 4 FB-Zelllinien, 10 Kokulturen mit primär EC und 4 Kokulturen mit primär FB.

Die Kultivierung unter Fluss bewies, dass die gewonnenen EC sich erfolgreich an ihr Umfeld anpassen. Die Zellen und das Aktin richteten sich häufiger parallel zum Fluss aus. Es kam zu einer erhöhten Zellproliferation und Zunahme der Zell-Zell-Kontakte im Vergleich zur statischen Kontrolle. Diese Eigenschaften sind essenziell für eine lange Haltbarkeit und Widerstandsfähigkeit der Klappen in vivo.

In weiteren Versuchen ist die Reinheit der Zellkulturen zu optimieren und ein ausgewogenes Verhältnis von gewonnenen EC zu FB zu schaffen. Zudem sollte die Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen postoperativ aus der HLM untersucht werden, da diese Zellen ein großes Potential für das TE aufweisen könnten.

Die Methodik erwies sich als schnelle, zuverlässige und preisgünstige Methode mit geringen ethischen Hürden, da die Reservoir der HLM postoperativ als Abfallprodukt entsorgt werden. Besonders zum Gewinn autologer Zellen ist der Ansatz höchst vielversprechend.

## XI. Literaturverzeichnis

1. Kodali, S.K., et al., Valvular Heart Disease in Patients >/=80 Years of Age. *J Am Coll Cardiol*, 2018. 71(18): p. 2058-2072.
2. Benninghoff, A. and D. Drenckhahn, *Taschenbuch Anatomie*. 2008: Elsevier, Urban & Fischer.
3. Zhang, Y.S., et al., 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Ann Biomed Eng*, 2017. 45(1): p. 148-163.
4. Mendelson, K. and F.J. Schoen, Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng*, 2006. 34(12): p. 1799-819.
5. Combs, M.D. and K.E. Yutzey, Heart valve development: regulatory networks in development and disease. *Circ Res*, 2009. 105(5): p. 408-21.
6. Hinton, R.B. and K.E. Yutzey, Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol*, 2011. 73: p. 29-46.
7. Sacks, M.S. and A.P. Yoganathan, Heart valve function: a biomechanical perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007. 362(1484): p. 1369-91.
8. Hofferberth, S. and F. J. Schoen, Development of a Living Tissue Heart Valve: Heart Valve Tissue Engineering. 2019.
9. Arastéh, K., et al., *Duale Reihe Innere Medizin*. 2018: Thieme.
10. Ziemer, G. and A. Haverich, *Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und an den herznahen Gefäßen*. 2010: Springer Berlin Heidelberg.
11. Bundesärztekammer (BÄK), K.B.K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen und M.F. (AWMF), Nationale Versorgungs-Leitlinie, Chronische Herzinsuffizienz, Langfassung, 2. Auflage. 2017.
12. Matt Oster, M., MPH, Newborn screening for critical congenital heart disease using pulse oximetry.
13. Hoffman, J.I. and S. Kaplan, The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*, 2002. 39(12): p. 1890-900.
14. Oster, M.E., et al., Temporal trends in survival among infants with critical congenital heart defects. *Pediatrics*, 2013. 131(5): p. e1502-8.
15. Beckmann, A., et al., German Heart Surgery Report 2018: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2019. 67(5): p. 331-344.
16. Gray, L.A., et al., Genome-Wide Analysis of Genetic Risk Factors for Rheumatic Heart Disease in Aboriginal Australians Provides Support for Pathogenic Molecular Mimicry. *J Infect Dis*, 2017. 216(11): p. 1460-1470.
17. Cunningham, M.W., T cell mimicry in inflammatory heart disease. *Mol Immunol*, 2004. 40(14-15): p. 1121-7.
18. Carapetis, J.R., et al., Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. 2: p. 15084.
19. Katzenellenbogen, J.M., et al., Rheumatic heart disease: infectious disease origin, chronic care approach. *BMC Health Serv Res*, 2017. 17(1): p. 793.
20. Unger, P., et al., Management of multiple valve disease. *Heart*, 2011. 97(4): p. 272-7.
21. Mohler, E.R., 3rd, et al., Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*, 2001. 103(11): p. 1522-8.
22. Nkomo, V.T., et al., Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet*, 2006. 368(9540): p. 1005-11.

23. Hopkins, R.A., J. St Louis, and P.C. Corcoran, Ross' first homograft replacement of the aortic valve. *Ann Thorac Surg*, 1991. 52(5): p. 1190-3.
24. Beckmann, A., et al., German Heart Surgery Report 2016: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2017. 65(7): p. 505-518.
25. Beckmann, A., et al., German Heart Surgery Report 2017: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2018. 66(8): p. 608-621.
26. Market research future. [03.02.2020]; Available from: <https://www.marketresearchfuture.com/reports/cardiac-valve-market-560>.
27. Bento, D., et al., Surgical aortic valve replacement improves the quality of life of octogenarians with severe aortic stenosis. *Rev Port Cardiol*, 2019. 38(4): p. 251-258.
28. Falk, V., et al., 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2017. 52(4): p. 616-664.
29. Daniel, W.G., et al., Klappenvitien im Erwachsenenalter. *Clin Res Cardiol*, 2006. 95(11): p. 620-41.
30. Dijkman, P.E., et al., Heart Valve Replacements with Regenerative Capacity. *Transfus Med Hemother*, 2016. 43(4): p. 282-290.
31. Pretre, R. and M.I. Turina, Cardiac valve surgery in the octogenarian. *Heart*, 2000. 83(1): p. 116-21.
32. BVMed. [03.12.2018]; Available from: <https://www.bvmed.de/de/bvmed/mediathek/bilder-medizinprodukte/herzklappe-mechanisch-sjm-regent.jpg>.
33. Navia, J.L., et al., Transcatheter Tricuspid Valve Implantation of NaviGate Bioprostheses in a Preclinical Model. *JACC Basic Transl Sci*, 2018. 3(1): p. 67-79.
34. Verheugt, F.W., Anticoagulation in patients with mechanical heart valves: follow the guidelines! *Neth Heart J*, 2015. 23(2): p. 109-10.
35. Vesely, I., The evolution of bioprosthetic heart valve design and its impact on durability. *Cardiovasc Pathol*, 2003. 12(5): p. 277-86.
36. Hammermeister, K., et al., Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J Am Coll Cardiol*, 2000. 36(4): p. 1152-8.
37. Stassano, P., et al., Aortic valve replacement: a prospective randomized evaluation of mechanical versus biological valves in patients ages 55 to 70 years. *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(20): p. 1862-8.
38. Lund, O. and M. Bland, Risk-corrected impact of mechanical versus bioprosthetic valves on long-term mortality after aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006. 132(1): p. 20-6.
39. Rahimtoola, S.H., Choice of prosthetic heart valve for adult patients. *J Am Coll Cardiol*, 2003. 41(6): p. 893-904.
40. Alsoufi, B., Aortic valve replacement in children: Options and outcomes. *J Saudi Heart Assoc*, 2014. 26(1): p. 33-41.
41. Kanter, K.R., et al., One hundred pulmonary valve replacements in children after relief of right ventricular outflow tract obstruction. *Ann Thorac Surg*, 2002. 73(6): p. 1801-6; discussion 1806-7.
42. Ross, D., M. Jackson, and J. Davies, The pulmonary autograft--a permanent aortic valve. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1992. 6(3): p. 113-6; discussion 117.

43. Jonas, R.A., The Ross procedure is not the procedure of choice for the teenager requiring aortic valve replacement. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*, 2005: p. 176-80.
44. Langer, R. and J.P. Vacanti, Tissue engineering. *Science*, 1993. 260(5110): p. 920-6.
45. Ozbolat, I.T., 3D Bioprinting: Fundamentals, Principles and Applications. 2016: Elsevier Science.
46. Cebotari, S., et al., [Heart valve and myocardial tissue engineering]. *Herz*, 2010. 35(5): p. 334-41.
47. Simionescu, D.T., et al., Form Follows Function: Advances in Trilayered Structure Replication for Aortic Heart Valve Tissue Engineering. *J Healthc Eng*, 2012. 3(2): p. 179-202.
48. Jana, S., R.T. Tranquillo, and A. Lerman, Cells for tissue engineering of cardiac valves. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015.
49. Gulbins, H., et al., Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003. 125(3): p. 592-601.
50. Armstrong, E.J. and J. Bischoff, Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res*, 2004. 95(5): p. 459-70.
51. Butcher, J.T. and R.M. Nerem, Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007. 362(1484): p. 1445-57.
52. Aikawa, E., et al., Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. *Circulation*, 2006. 113(10): p. 1344-52.
53. Wang, H., et al., Redirecting valvular myofibroblasts into dormant fibroblasts through light-mediated reduction in substrate modulus. *PLoS One*, 2012. 7(7): p. e39969.
54. Messier, R.H., Jr., et al., Dual structural and functional phenotypes of the porcine aortic valve interstitial population: characteristics of the leaflet myofibroblast. *J Surg Res*, 1994. 57(1): p. 1-21.
55. Ikada, Y., Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*, 2006. 3(10): p. 589-601.
56. Johnson, D.L., M.L. Rose, and M.H. Yacoub, Immunogenicity of human heart valve endothelial cells and fibroblasts. *Transplant Proc*, 1997. 29(1-2): p. 984-5.
57. Cuy, J.L., et al., Adhesive protein interactions with chitosan: consequences for valve endothelial cell growth on tissue-engineering materials. *J Biomed Mater Res A*, 2003. 67(2): p. 538-47.
58. Hoerstrup, S.P., et al., Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation*, 2000. 102(19 Suppl 3): p. III44-9.
59. Thierfelder, N., et al., In vitro comparison of novel polyurethane aortic valves and homografts after seeding and conditioning. *ASAIO J*, 2013. 59(3): p. 309-16.
60. Sales, V.L., et al., Endothelial progenitor cells as a sole source for ex vivo seeding of tissue-engineered heart valves. *Tissue Eng Part A*, 2010. 16(1): p. 257-67.
61. Schmidt, D., et al., Cryopreserved amniotic fluid-derived cells: a lifelong autologous fetal stem cell source for heart valve tissue engineering. *J Heart Valve Dis*, 2008. 17(4): p. 446-55; discussion 455.
62. Schmidt, D., et al., Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors. *Circulation*, 2006. 114(1 Suppl): p. I125-31.

63. Schmidt, D., et al., Minimally-invasive implantation of living tissue engineered heart valves: a comprehensive approach from autologous vascular cells to stem cells. *J Am Coll Cardiol*, 2010. 56(6): p. 510-20.
64. Juthier, F., et al., Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006. 131(4): p. 843-52.
65. Weber, B., et al., Prenatally engineered autologous amniotic fluid stem cell-based heart valves in the fetal circulation. *Biomaterials*, 2012. 33(16): p. 4031-43.
66. Hockaday, L.A., et al., Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication*, 2012. 4(3): p. 035005.
67. Masoumi, N., et al., Electrospun PGS:PCL microfibers align human valvular interstitial cells and provide tunable scaffold anisotropy. *Adv Healthc Mater*, 2014. 3(6): p. 929-39.
68. Sutherland, F.W., et al., From stem cells to viable autologous semilunar heart valve. *Circulation*, 2005. 111(21): p. 2783-91.
69. Simon P. Hoerstrup, A.K., Ralf Sodian, Tissue Engineering of Functional Trileaflet Heart Valves From Human Marrow Stromal Cells. *Circulation*, 2002. 106: p. 143-150.
70. Colazzo, F., et al., Extracellular matrix production by adipose-derived stem cells: implications for heart valve tissue engineering. *Biomaterials*, 2011. 32(1): p. 119-27.
71. Schmidt, D., et al., Engineering of biologically active living heart valve leaflets using human umbilical cord-derived progenitor cells. *Tissue Eng*, 2006. 12(11): p. 3223-32.
72. Sodian, R., et al., Use of human umbilical cord blood-derived progenitor cells for tissue-engineered heart valves. *Ann Thorac Surg*, 2010. 89(3): p. 819-28.
73. Schmidt, D., et al., Prenatally fabricated autologous human living heart valves based on amniotic fluid derived progenitor cells as single cell source. *Circulation*, 2007. 116(11 Suppl): p. I64-70.
74. Takahashi, K. and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006. 126(4): p. 663-76.
75. da Costa, F.D., et al., The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts. *Ann Thorac Surg*, 2010. 90(6): p. 1854-60.
76. Sarraf, C.E., et al., Cell proliferation rates in an artificial tissue-engineered environment. *Cell Prolif*, 2005. 38(4): p. 215-21.
77. Poggio, P., et al., Noggin attenuates the osteogenic activation of human valve interstitial cells in aortic valve sclerosis. *Cardiovasc Res*, 2013. 98(3): p. 402-10.
78. Bin, F., et al., Construction of tissue-engineered homograft bioprosthetic heart valves in vitro. *ASAIO J*, 2006. 52(3): p. 303-9.
79. Gao, Y. and J.G. Jacot, Stem Cells and Progenitor Cells for Tissue-Engineered Solutions to Congenital Heart Defects. *Biomark Insights*, 2015. 10(Suppl 1): p. 139-46.
80. Jana, S., et al., Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves. *Acta Biomater*, 2014. 10(7): p. 2877-93.
81. Starnecker, F., et al., Tissue-engineering acellular scaffolds-The significant influence of physical and procedural decellularization factors. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2018. 106(1): p. 153-162.
82. Dohmen, P.M. and W. Konertz, Tissue-engineered heart valve scaffolds. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2009. 15(6): p. 362-7.

83. Ceonzo, K., et al., Polyglycolic acid-induced inflammation: role of hydrolysis and resulting complement activation. *Tissue Eng*, 2006. 12(2): p. 301-8.
84. Shinoka, T., et al., Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg*, 1995. 60(6 Suppl): p. S513-6.
85. Ramaswamy, S., et al., The role of organ level conditioning on the promotion of engineered heart valve tissue development in-vitro using mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2010. 31(6): p. 1114-25.
86. Dohmen, P.M., et al., Ross operation with a tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg*, 2002. 74(5): p. 1438-42.
87. Dohmen, P.M., et al., Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve. *Ann Thorac Surg*, 2011. 92(4): p. 1308-14.
88. Cebotari, S., et al., Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation*, 2006. 114(1 Suppl): p. I132-7.
89. Dohmen, P.M., et al., Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure. *Ann Thorac Surg*, 2007. 84(3): p. 729-36.
90. Schneider, P.J. and J.D. Deck, Tissue and cell renewal in the natural aortic valve of rats: an autoradiographic study. *Cardiovasc Res*, 1981. 15(4): p. 181-9.
91. Meinel, L., et al., Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng*, 2004. 32(1): p. 112-22.
92. Davies, P.F., Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2009. 6(1): p. 16-26.
93. Ju, Y.M., et al., Electrospun vascular scaffold for cellularized small diameter blood vessels: A preclinical large animal study. *Acta Biomater*, 2017. 59: p. 58-67.
94. Arjunon, S., et al., Aortic valve: mechanical environment and mechanobiology. *Ann Biomed Eng*, 2013. 41(7): p. 1331-46.
95. Weston, M.W., D.V. LaBorde, and A.P. Yoganathan, Estimation of the shear stress on the surface of an aortic valve leaflet. *Ann Biomed Eng*, 1999. 27(4): p. 572-9.
96. F. Davies, P., Hemodynamics in the determination of endothelial phenotype and flow mechanotransduction. 2007. 230-245.
97. Davies, P.F., Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, 1995. 75(3): p. 519-60.
98. Merryman, W.D., et al., Correlation between heart valve interstitial cell stiffness and transvalvular pressure: implications for collagen biosynthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 290(1): p. H224-31.
99. Neuenschwander, S. and S.P. Hoerstrup, Heart valve tissue engineering. *Transpl Immunol*, 2004. 12(3-4): p. 359-65.
100. von Nathusius, S., et al., The cardiotomy reservoir - a preliminary evaluation of a new cell source for cardiovascular tissue engineering. *Int J Artif Organs*, 2017: p. 0.
101. Delorme, B., et al., Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *Thromb Haemost*, 2005. 94(6): p. 1270-9.
102. Gaynor, E., C. Bouvier, and T.H. Spaet, Vascular lesions: possible pathogenetic basis of the generalized Shwartzman reaction. *Science*, 1970. 170(3961): p. 986-8.
103. Erdbruegger, U., M. Haubitz, and A. Woywodt, Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. *Clin Chim Acta*, 2006. 373(1-2): p. 17-26.

104. Scheubel, R.J., et al., Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*, 2003. 42(12): p. 2073-80.
105. Woywodt, A., et al., Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant*, 2002. 17(10): p. 1728-30.
106. Mutin, M., et al., Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*, 1999. 93(9): p. 2951-8.
107. Bonello, L., et al., Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(5): p. 979-81.
108. Freestone, B., et al., Circulating endothelial cells in atrial fibrillation with and without acute cardiovascular disease. *Thromb Haemost*, 2005. 94(4): p. 702-6.
109. Nadar, S.K., et al., Circulating endothelial cells in acute ischaemic stroke. *Thromb Haemost*, 2005. 94(4): p. 707-12.
110. McClung, J.A., et al., Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA(1)c. *Diabetologia*, 2005. 48(2): p. 345-50.
111. Mutunga, M., et al., Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. 163(1): p. 195-200.
112. Sabashnikov, A., et al., Enumeration of circulating endothelial cell frequency as a diagnostic marker in aortic valve surgery - a flow cytometric approach. *J Cardiothorac Surg*, 2017. 12(1): p. 68.
113. Asahara, T., et al., Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997. 275(5302): p. 964-7.
114. Passaroni, A.C., M.A. Silva, and W.B. Yoshida, Cardiopulmonary bypass: development of John Gibbon's heart-lung machine. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 2015. 30(2): p. 235-45.
115. Groesdonk, H.V. and R. Larsen, *Anästhesie und Intensivmedizin in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*. 2016: Springer Berlin Heidelberg.
116. Münster, U. *Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Aufbau der Herz-Lungen-Maschine*. 18.04.2018; Available from: [https://www.ukm.de/index.php?id=herzchirurgie\\_hlm](https://www.ukm.de/index.php?id=herzchirurgie_hlm).
117. Wittwer, T., et al., Off-pump or minimized on-pump coronary surgery--initial experience with Circulating Endothelial Cells (CEC) as a supersensitive marker of tissue damage. *J Cardiothorac Surg*, 2011. 6: p. 142.
118. Schmid, F.X., et al., Direct evidence of endothelial injury during cardiopulmonary bypass by demonstration of circulating endothelial cells. *Perfusion*, 2006. 21(3): p. 133-7.
119. Hoesli, S.J., et al., Endothelial colony-forming cells and mesenchymal stem cells from ECMO circuits of term infants. *J Perinatol*, 2010. 30(11): p. 724-30.
120. Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999. 284(5411): p. 143-7.
121. Hladovec, J., et al., Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klin Wochenschr*, 1978. 56(20): p. 1033-6.
122. Yoder, M.C., et al., Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*, 2007. 109(5): p. 1801-9.
123. Woywodt, A., et al., Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(3): p. 671-7.

124. Luttmann, W., et al., *Der Experimentator: Immunologie*. 2014: Springer Berlin Heidelberg.
125. Boyum, A., et al., Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. *Scand J Immunol*, 1991. 34(6): p. 697-712.
126. Lu, Y., et al., Impact of Ficoll density gradient centrifugation on major and trace element concentrations in erythrocytes and blood plasma. *J Trace Elem Med Biol*, 2015. 29: p. 249-54.
127. Fribourg, U.d. Division of Histology. 2018 18.04.2018]; Available from: <http://www.unifr.ch/anatomy/elearning/de/bindegewebe/zelle/fixe/d-endothel.php>  
<http://www.unifr.ch/anatomy/elearning/de/bindegewebe/zelle/fixe/d-fibroblast.php>
128. Witzel, K., In-vitro Tissue Engineering von zellbesiedelten Polyurethan-Scaffolds: Bildung von extrazellulärer Matrix unter Einfluss von endothelialer Beschichtung und pulsatilem Fluss, in *Medizinische Fakultät*. 2020, Ludwig-Maximilians-Universität München.
129. Hayflick, L., The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, 1965. 37: p. 614-36.
130. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. 2011: Spektrum Akademischer Verlag.
131. Gentaur, DHC-N01 (Neubauer Improved). 2019.
132. Farr, A.G. and P.K. Nakane, Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review. *J Immunol Methods*, 1981. 47(2): p. 129-44.
133. Mulisch, M. and U. Welsch, *Romeis - Mikroskopische Technik*. 2015: Springer Berlin Heidelberg.
134. Cell & Tissue Staining Kits. 26.04.2020]; Available from: <https://www.rndsystems.com/products/cell-tissue-staining-kits>.
135. The Human Protein Atlas Version 19.3. 2020 26.04.2020]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/>.
136. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cyotherapy*, 2006. 8(4): p. 315-7.
137. focus, I.C.i. Ibidi Pump System. 01.02.2020]; Available from: <https://ibidi.com/perfusion-system/112-ibidi-pump-system.html>.
138. El-Sharkawy, A., Calculate the Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF). 2016.
139. Driessen-Mol, A., et al., Transcatheter implantation of homologous "off-the-shelf" tissue-engineered heart valves with self-repair capacity: long-term functionality and rapid in vivo remodeling in sheep. *J Am Coll Cardiol*, 2014. 63(13): p. 1320-9.
140. Thierfelder, K.N.F., In vitro Vergleich von zellbesiedelten und konditionierten neu entwickelten Polyurethanaortenklappenprothesen und Homografts. 2014.
141. Shimoni, S., et al., Circulating Endothelial Progenitor Cells and Clinical Outcome in Patients with Aortic Stenosis. *PLoS One*, 2016. 11(2): p. e0148766.
142. Zubair, A.C., et al., Evaluation of mobilized peripheral blood CD34(+) cells from patients with severe coronary artery disease as a source of endothelial progenitor cells. *Cyotherapy*, 2010. 12(2): p. 178-89.
143. Takahashi, T., et al., Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 1999. 5(4): p. 434-8.

144. Antonio, N., et al., Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative effect of several cardiovascular drugs. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010. 66(3): p. 219-30.
145. Ladhoff, J., et al., Immune privilege of endothelial cells differentiated from endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*, 2010. 88(1): p. 121-9.
146. Lin, Y., et al., Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*, 2000. 105(1): p. 71-7.
147. Hill, J.M., et al., Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 2003. 348(7): p. 593-600.
148. Toledo-Piza, A.R., et al., Proliferation of fibroblasts and endothelial cells is enhanced by treatment with *Phyllocaulis boraceiensis* mucus. *Cell Prolif*, 2013. 46(1): p. 97-108.
149. Prokopi, M., et al., Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood*, 2009. 114(3): p. 723-32.
150. Woywodt, A., et al., Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet*, 2003. 361(9353): p. 206-10.
151. Schrödel, A., Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien. *Biologie in unserer Zeit*, 2007. 37(5): p. 289-289.
152. Blancas, A.A., et al., Endothelial cells from embryonic stem cells in a chemically defined medium. *Stem Cells Dev*, 2011. 20(12): p. 2153-61.
153. Rabkin-Aikawa, E., et al., Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J Heart Valve Dis*, 2004. 13(5): p. 841-7.
154. Steinhoff, G., et al., Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation*, 2000. 102(19 Suppl 3): p. III50-5.
155. Dube, J., et al., Progress in developing a living human tissue-engineered tri-leaflet heart valve assembled from tissue produced by the self-assembly approach. *Acta Biomater*, 2014. 10(8): p. 3563-70.
156. Badura-Lotter, G., *Forschung an embryonalen Stammzellen: zwischen biomedizinischer Ambition und ethischer Reflexion*. 2005: Campus.
157. Mayshar, Y., et al., Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010. 7(4): p. 521-31.
158. Trivanovic, D., et al., Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp Arh Celok Lek*, 2013. 141(3-4): p. 178-86.
159. Henderson, K., et al., Biomechanical Regulation of Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*, 2017. 6(22).
160. Seebach, J., et al., Regulation of endothelial barrier function during flow-induced conversion to an arterial phenotype. *Cardiovasc Res*, 2007. 75(3): p. 596-607.
161. Kutikhin, A.G., et al., Shear stress: An essential driver of endothelial progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*, 2018. 118: p. 46-69.
162. Rath, S., et al., Differentiation and Distribution of Marrow Stem Cells in Flex-Flow Environments Demonstrate Support of the Valvular Phenotype. *PLoS One*, 2015. 10(11): p. e0141802.
163. Blancas, A.A., et al., Identifying Behavioral Phenotypes and Heterogeneity in Heart Valve Surface Endothelium. *Cells Tissues Organs*, 2016. 201(4): p. 268-76.
164. Butcher, J.T., et al., Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(8): p. 1429-34.

165. Trixi Hollweck, C.H., Günther Eissner, Mesenchymal stem cells from umbilical cord tissue as potential therapeutics for cardiomydегertive diseases- a review. *Int J Mol Cell Med* summer, 2012. 1(3): p. 119-132.
166. Mair, D.D., F.J. Puga, and G.K. Danielson, The Fontan procedure for tricuspid atresia: early and late results of a 25-year experience with 216 patients. *J Am Coll Cardiol*, 2001. 37(3): p. 933-9.

## XII. Appendix

### XII.1 Material, Lösungen und Geräte

Name	Hersteller	Firmensitz	Lot-Nummer
<b>Material</b>			
µ-Slides I-Luer 0.6 Luer	Ibidi GmbH	Martinsried, GER	80182
Collagen IV			
10ml Stripette	Corning Incorporated	Corning, NY, USA	4251
2-200µl Biosphere Quality Tips			70.760.202
25ml Stripette	Corning Incorporated	Corning, NY, USA	4101
8-well auf Glas ablösbar	Sarstedt AG & Co.	Nürmbrecht, GER	
Abdeckung, steril	Secudrape		508825
Bacillol AF	Bode Chemie	Hamburg, GER	973380
CryoPure Gefäß 1,8ml	Sarstedt AG & Co.	Nürmbrecht, GER	72.379.004
Deckgläser 50x24mm	Roth	Karlsruhe, GER	1871
Eimer	Nalgene		
Falcon Röhrchen	Sarstedt AG	Nürmbrecht, GER	
Fermacidal D2, Desinfektionsmittel für Flächen und Gegenstände	DROL-Laborgeräte	Reichtertshausen, GER	N24040
Handschuhe vasco basic	braun	Melsungen, GER	
Kardiotoriereservoir, Inspire 6 Dual	Sorin Group	Mirandola, ITA	50719
Neubauer Zählkammer, Improved C-Chip	Digital Bio, über Biochrom AG Berlin, GER	Korea	
Perfusionsset	Ibidi GmbH	Martinsried, GER	10964
Petrischalen	Sarstedt AG	Nürmbrecht, GER	
Pipetten	Sarstedt AG	Nürmbrecht, GER	
Pipettenspitzen Biosphere filter tips: 10µl steril, 100µl steril	Sarstedt AG & Co.	Nürmbrecht, GER	701.116.210, 701.186.210
Sterile Handschuhe: Gentle skin premium OP	Rösner-Mautby Meditrade gmbh	Kiefersfelden, GER	
Sterillium	Bode Chemie	Hamburg, GER	975512
T25 Falcon	Becton Dickinson	Le pont de claix, FRA	353808
T75, T175	Sarstedt AG & Co.	Nürmbrecht, GER	
Transferpipette 3,5ml	Sarstedt AG & Co.	Nürmbrecht, GER	8.611.171
Zellkultur Testplatte 96 Vertiefungen	TRP	CH	92096
Zellkulturplatte 24 Vertiefungen	Corning Incorporated	Corning, NY, USA	353047
<b>Zellisolation</b>			
Biocoll separating solution	Biochrom Gmbh	Berlin, GER	
EC Growth Medium supplement	Promocell GmbH	Heidelberg, GER	C-39210
Pack			
FB Growth Medium supplement	Promocell GmbH	Heidelberg, GER	C-23110
Pack			
Growth Medium EC	Promocell GmbH	Heidelberg, GER	C-22010
Growth Medium FB	Promocell GmbH	Heidelberg, GER	C-23010
M199 Earle's	Biochrom Gmbh	Berlin, GER	F-0665

PBS steril	Biochrom GmbH	Berlin, GER	L-182-50
Penicillin- Streptomycin Solution Stabilized	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, GER	P4458

### **WST- Viabilitätsbestimmung**

Trypanblau - Lösung 0,4%	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, GER	T8154
WST-1	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, GER	11644807001

### **Zellkultur**

Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, GER	D5879
Trypsin-EDTA Lösung 10x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, GER	T-4174

### **Immunfluoreszenz**

Anti-Mouse IgG, CF555	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Darmstadt, GER	SAB4600066
Anti-rabbit IgG, CF488A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Darmstadt, GER	SAB4600234
BRIJ-35 (PBS1l+ BRIJ 1,25ml) 0,1%	Merck KgaA	Darmstadt, GER	
BSA cd 73, 90, 105, 45	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, GER	A7906-100G
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH		D9564
Ibidi Mounting Medium	Ibidi GmbH	Martinsried, GER	5001
PBS Dulbecco w/o Ca2+	Biochrom AG	Berlin, GER	L 182-50
PFA			
Triton-X	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, GER	3051
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, GER	P1379-1L

### **Immunhistochemie**

ACE Substrate Kit	Vector Alexis	Deutschland	SK4200
Alpha-Aktin Antikörper	DakoCytomation	Hamburg, GER	
Ampuwa Aqua ad iniektabilia	Fresenius Kbi	Bad Homburg, GER	1080181
Antibody Diluent	DakoCytomation	Hamburg, GER	S0809
Anti-Fibroblast, clone TE-7, 0,1mg/ml	Chemicon-Millipore GmbH	Schwalbach/Ts., GER	CBL 271
Anti-VWF	Sigma-Aldrich	Darmstadt, GER	HPA001815
Aqua dest	Klinikum Großhadern	München, GER	
Cytoscan Biotinylated Link	Cell Marque, Sigma Aldrich	Darmstadt, GER	951D-32
Cytoscan HRP Label	Cell Marque, sigma aldrich	Darmstadt, GER	951D-31
Envision +Dual Link System HRP	DakoCytomation	Hamburg, GER	K4061
Ethanol 96%, vergällt	Apotheke Klinikum Großhadern		
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA	Darmstadt, GER	1.092.490.500
Myosin heavy chain			
PECAM, CD31 Antikörper, 1:30	DakoCytomation	Hamburg, GER	M0823
SMC-Myosin Antikörper, 954 mg/l	DakoCytomation	Hamburg, GER	M-3558

Ultramount, Aqueos Permanent Mounting Medium	DakoCytomation	Hamburg, GER	S1964
VE-Cadherin Clone TEA 1/31, 0,2mg/ml	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, GER	PN IM 1597
Wasserstoffperoxid, 30%	Merck KGaA	Darmstadt, GER	21676-3

### Flussversuch

Sir-Actin	Spirochrome	CH	
Verapamil	Spirochrome	CH	

### Geräte

Ascent Software	Thermo electron corporation	Shanghai, China	
Axio Observer	Zeiss MicroImaging GmbH	Jena, GER	
AxioVs40 4.8.2.0			
Fluidic Unit	Ibidi GmbH	Martinsried, GER	10903
Fluoreszenzlampe	hxp 120		
Gefrierschrank	HERA freeze, Thermo Scientific		
Ibidi Pumpe	Ibidi GmbH	Martinsried, GER	P00000006
Inkubationsschrank	Binder GmbH		
Kompaktschüttler KS 15 +	Edmund Bühler GmbH	Hechingen, GER	6171000,
Inkubationshaube TH 15			6161000
Kühlschrank	Liebherr, Glass line		
Laminar Airflow "Hera Safe"	Kendro Lab Products	Hanau, GER	
Mikroskop	Zeiss Axiovert 35	Jena, GER	
Photometer, Multiscan Ex	Thermo electron corporation	Shanghai, China	51118170
Pipetboy	Eppendorf AG	Hamburg, GER	
PumpControl v1.5.0	Ibidi GmbH	Martinsried, GER	
Wasserbad "Julabo SW23"	Kendro Lab Products	Hanau, GER	
Zentrifuge, Rotina 46R	Hettich	Tuttlingen, GER	

## **XII.2 Danksagung**

Herzlichen Dank an meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Hagl, der es mir ermöglicht hat, an seinem Institut der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München meine Promotion durchzuführen.

Meine besondere Dankbarkeit gilt meinen Betreuern Dr. med. Nikolaus Thierfelder, Dipl.-Ing. Fabian König und Maximilian Grab (M. Sc.). Sie standen mir jederzeit für die Planung und Umsetzung der Doktorarbeit bei. Mit ihrer Erfahrung in der wissenschaftlichen Arbeit und in der praktischen Laborarbeit selbst, den Kontakten zu anderen Disziplinen im Haus und dem immerzu hohen Engagement für uns Doktoranden wurde mir der Weg zur Promotion erheblich erleichtert. Besonders bei der Hilfe und dem konstruktiven Feedback im Schreibprozess schätzte ich eure ständige Erreichbarkeit und die immer schnellen Antworten.

Danke für meine Einführung in die Methodik durch Sophie Natusius sowie durch Helene Fiedler für die Einführung in die Ibidi Experimente. Ich bedanke mich bei Eike Petersen und Barbara Steinl die mir bei den Experimenten stets hilfsbereit und geduldig zur Seite standen und viele gute Verbesserungsideen hatten.

Der Kardiotechnik der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Universität München unter der Leitung von Frank Born (M. Sc.) danke ich herzlichst für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Kardiotomiereservoir. Bei Frau Dr. rer. nat. Maryna Bondarava möchte ich mich für die Unterstützung bei der Stammzellfärbung bedanken. Freundlicherweise stellte sie uns auch die benötigten Marker zur Verfügung.

Nicht zuletzt geht mein Dank an meine Familie, an Marvin Würth sowie meinen Partner Benni ohne deren Rückhalt und Beistand die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

## **XII.3 Eidestattliche Versicherung**

Name: Schwender

Vorname: Hannah Sophie

Matrikel-Nr.:

Studiengang: Humanmedizin

TUM: 03665051

Hiermit versichere ich, Hannah Sophie Schwender, an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit mit dem Titel: „Evaluation einer neuartigen Zellquelle im kardiovaskulären Tissue Engineering – Die Herz-Lungen-Maschine“ selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen wurden, sind in jedem Fall unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht oder in anderer Form als Prüfungsleistung vorgelegt worden.

Ich habe die Bedeutung der eidestattlichen Versicherung und prüfungsrechtlichen Folgen (§ 26 Abs. 2 Bachelor-SPO bzw. § 19 Abs. 2 Master-SPO der Hochschule der Medien Stuttgart) sowie die strafrechtlichen Folgen (siehe unten) einer unrichtigen oder unvollständigen eidestattlichen Versicherung zur Kenntnis genommen.

## **Auszug aus dem Strafgesetzbuch (StGB)**

### **§ 156 StGB Falsche Versicherung an Eides Statt**

Wer von einer zur Abnahme einer Versicherung an Eides Statt zuständigen Behörde eine solche Versicherung falsch abgibt oder unter Berufung auf eine solche Versicherung falsch aussagt, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

St. Gallen, 04.05.2020

Ort, Datum

Hannah Schwender

Unterschrift