

IN VITRO  
ENDOTHELIALISIERUNG  
GLUTARALDEHYDFIXIERTER  
PORCINER HERZKLAPPEN

Angelika Goldemund

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. B. Reichart

IN VITRO  
ENDOTHELIALISIERUNG  
GLUTARALDEHYDFIXIERTER  
PORCINER HERZKLAPPEN

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

vorgelegt von  
Angelika Goldemund  
aus München  
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. J.M. Schmoeckel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. S. Nees

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter: Dr. med. H. Gulbins

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2005

Meiner Mutter in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München bereits veröffentlicht:

Gulbins H., Goldemund A., Anderson I., Haas U., Uhlig A., Meiser B., Reichart B.  
Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003; 125: 592 – 601

# INHALTSVERZEICHNIS

<b><u>1.</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1.	Allgemeines	1
1.2.	Herzklappendefekte	1
1.3.	Herzklappenersatz	2
1.3.1.	Mechanische Herzklappenprothesen	2
1.3.2.	Biologische Herzklappenprothesen	2
1.4.	Degeneration biologischer Herzklappen	4
1.4.1.	Mineralisierung	4
1.4.2.	Immunologische Reaktion	4
1.5.	Endothelialisierung von biologischen Herzklappenprothesen	5
1.6.	Zielsetzung	6
<b><u>2.</u></b>	<b><u>Material</u></b>	<b>8</b>
2.1.	Reagenzien und Zellkulturmedien	8
2.2.	Reagenzien und Antikörper für die Immunhistochemie	9
2.3.	Geräte	10
2.4.	Verbrauchsmaterial (Einmalartikel, steril und unsteril)	11
2.5.	Verbrauchsmaterial (wiederverwendbar, autoklavier-/desinfizierbar)	12
2.6.	Medienzusammensetzung	12
2.7.	Biologisches Material	14
2.7.1.	<i>Vena saphena magna</i> für die Gewinnung von Fibroblasten- und Endothelzellprimärkulturen	14
2.7.2.	Schweineherzklappen	14
2.7.3.	Porcine Bioprothesen der Firma Medtronic	15
<b><u>3.</u></b>	<b><u>Methoden</u></b>	<b>18</b>
3.1.	Zellkultur	18
3.1.1.	Allgemeine Bedingungen	18
3.1.2.	Zellgewinnung	18
3.1.3.	Trypsinieren und Passagieren der Zellen	19

3.1.4.	Bestimmung der Lebendzellzahl	20
3.1.5.	Intravitalfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26	20
3.2.	Vorbereitung von Schweineherzklappen	21
3.2.1.	Präparation	21
3.2.2.	Kryopräservation	21
3.2.3.	Auftauen	22
3.2.4.	Fixierung	22
3.3.	Vorbehandlung von fixierten Schweineherzklappen und Bioprothesen	22
3.3.1.	Spülung und Säurebehandlung	22
3.3.2.	Gruppeneinteilung	23
3.4.	Probenaufbereitung für das Rasterelektronenmikroskop	25
3.4.1.	Fixierung	25
3.4.2.	Aufsteigende Alkoholreihe	26
3.4.3.	Kritisch-Punkt-Trocknen	26
3.4.4.	Gold-Palladium Sputtern	26
3.4.5.	Rasterelektronenmikroskopie	27
3.5.	Vorbereitung von Zellen bzw. Gewebe für Untersuchungen am Phasenkontrastmikroskop	27
3.5.1.	Zellen	27
3.5.2.	Gewebestücke (Patches)	27
3.5.3.	Anfertigung von Gefrierschnitten	27
3.6.	Immunhistochemischer Nachweis	28
3.6.1.	FITC-markierte Sekundärantikörper	29
3.6.2.	LSAB <sup>®</sup> 2 System	29
3.6.3.	Negativkontrolle	30
3.7.	Beurteilung nativer Kontrollen	30
3.7.1.	Schweineherzklappen	30
3.7.1.1.	Am Rasterelektronenmikroskop	30
3.7.1.2.	Am Phasenkontrastmikroskop	31
3.7.2.	Medtronic Bioprothesen	33
3.7.2.1.	Am Rasterelektronenmikroskop	33

3.7.2.2. Am Phasenkontrastmikroskop	33
<b><u>4. Endothelialisierungsversuche</u></b>	<b>35</b>
4.1. Allgemeines	35
4.1.1. Zellbeschichtung in Gewebekulturplatten	35
4.1.2. Zellbeschichtung in der Beschichtungsapparatur	36
4.1.3. Probenentnahme und –untersuchung	37
4.2. Endothelialisierung von Schweineherzklappen	38
4.2.1. Untersuchung von SKL-Patches	38
4.2.1.1. Inkubation unterschiedlich vorbehandelter SKL-Patches mit konfluenten Endothelzellen (Toxizitätstest A)	38
4.2.1.2. Endothelialisierung unterschiedlich vorbehandelter SKL-Patches (Toxizitätstest B)	39
4.2.1.3. Endothelialisierung säurebehandelter SKL-Patches ohne und mit Fibroblastenvorbeschichtung	40
4.2.1.4. Vergleich der Endothelialisierung von zitronen- bzw. ascorbinsäure-behandelter Patches	40
4.2.1.5. Endothelialisierung säurebehandelter SKL-Patches mit PKH26-gefärbten Zellen	40
4.2.2. Endothelialisierung kompletter glutaraldehydfixierter Schweineherzklappen	41
4.2.2.1. Endothelialisierung von SKL nach unterschiedlicher Spülung	41
4.2.2.2. Endothelialisierung säurebehandelter SKL mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung	42
4.2.2.3. Endothelialisierung einer kryo- und einer nicht-kryopräservierten SKL	42
4.3. Endothelialisierung kommerzieller glutaraldehydfixierter Bioprothesen	42
4.3.1. Untersuchung von Patches aus Freestyle® Bioprothesen	43
4.3.1.1. Endothelialisierung säurebehandelter Bioprothesen-Patches mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung	43
4.3.1.2. Vergleich der Endothelialisierung zitronen- bzw. ascorbinsäurebehandelter Bioprothesen-Patches	43
4.3.2. Endothelialisierung von Mosaic® Bioprothesen	43
4.3.2.1. Endothelialisierung von Mosaic® Bioprothesen mit bzw. ohne Fibroblastenvorbeschichtung	43
4.3.2.2. Endothelialisierung säurebehandelter Mosaic® Bioprothesen nach Fibroblastenvorbeschichtung	44
4.3.3. Endothelialisierung von Freestyle® Bioprothesen	44

<b><u>5. Ergebnisse</u></b>	<b>45</b>
5.1. Allgemeines	45
5.1.1. Korrelation zwischen Vene und resultierender Primärkultur	45
5.1.2. Probleme bei der Probenaufbereitung von Klappensegeln	45
5.1.2.1. Probleme bei der Aufbereitung für das Rasterelektronenmikroskop	45
5.1.2.2. Probleme bei der Anfertigung von Gefrierschnitten	45
5.2. Endothelialisierung von Schweineherzklappen	46
5.2.1. Untersuchung von SKL-Patches (Vorversuche)	46
5.2.1.1. Inkubation unterschiedlich vorbehandelter SKL-Patches mit konfluenten Endothelzellen (Toxizitätstest A)	46
5.2.1.2. Endothelialisierung unterschiedlich vorbehandelter SKL-Patches mit Endothelzellen (Toxizitätstest B)	47
5.2.1.3. Endothelialisierung säurebehandelter SKL-Patches mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung	50
5.2.1.4. Vergleich der Endothelialisierung zitronen- bzw. ascorbinsäure-behandelter Patches	51
5.2.1.5. Endothelialisierung säurebehandelter SKL-Patches mit PKH26-gefärbten Zellen	53
5.2.2. Endothelialisierung kompletter, glutaraldehydfixierter Schweineherzklappen	54
5.2.2.1. Endothelialisierung von Schweineherzklappen nach unterschiedlicher Spülung	55
5.2.2.2. Endothelialisierung säurebehandelter Schweineherzklappen mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung	59
5.2.2.3. Endothelialisierung einer kryo- und einer nicht kryopräservierten SKL	66
5.3. Endothelialisierung kommerzieller glutaraldehydfixierter Bioprothesen	68
5.3.1. Untersuchung von Patches aus Freestyle® Bioprothesen	68
5.3.1.1. Endothelialisierung säurebehandelter Patches mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung	68
5.3.1.2. Vergleich der Endothelialisierung zitronen- bzw. ascorbinsäure-behandelter Patches	70
5.3.2. Endothelialisierung von Mosaic® Bioprothesen	71
5.3.2.1. Endothelialisierung von Mosaic® Bioprothesen mit bzw. ohne Fibroblastenvorbeschichtung	71
5.3.2.2. Endothelialisierung zitronensäurebehandelter Mosaic® Bioprothesen nach Fibroblastenvorbeschichtung	75
5.3.3. Endothelialisierung von Freestyle® Bioprothesen	77

<b><u>6.</u></b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>82</b>
6.1.	Zielsetzung und Beweisführung dieser Arbeit	82
6.2.	Eliminierung zelltoxischer Mengen Glutaraldehyds durch geeignete Spülung des porcinen Materials	85
6.3.	Einfluss einer Säurebehandlung auf die Endothelialisierung	86
6.4.	Einfluss einer Fibroblastenvorbeschichtung auf die Endothelialisierung	87
6.5.	Kombination von Spülung, Säure und Fibroblastenvorbeschichtung auf die Endothelialisierung	88
6.6.	Einfluss einer Kryopräservation auf die Endothelialisierung	89
6.7.	Endothelialisierung von Bioprothesen	90
6.7.1.	Endothelialisierung von Mosaic <sup>®</sup> Bioprothesen	90
6.7.2.	Endothelialisierung von Freestyle <sup>®</sup> Bioprothesen	91
6.8.	PKH26-Färbung	92
6.9.	Immunhistochemische Nachweise	92
6.9.1.	Nachweis von Faktor VIII Antigen und CD31	93
6.9.2.	Nachweis von Prolyl-4-Hydroxylase und CD90	93
6.9.3.	Nachweis von Kollagen IV und Laminin	94
6.10.	Einfluss der Zellzahl auf das Beschichtungsergebnis	95
<b><u>7.</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>97</b>
<b><u>8.</u></b>	<b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b>	<b>99</b>
<b><u>9.</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>100</b>
<b><u>10.</u></b>	<b><u>Danksagung</u></b>	<b>108</b>
<b><u>11.</u></b>	<b><u>Lebenslauf</u></b>	<b>109</b>

# **EINLEITUNG**

## **1. Einleitung**

### **1.1. Allgemeines**

Die vier Klappen des Herzens dienen als Ventile, die dem Blut im Wechsel von Kontraktion und Erschlaffung die Strömungsrichtung durch die Herzkammern vorgeben. Sind sie verengt (Stenose) oder schließen sie unzureichend (Insuffizienz) wird der Herzmuskel überlastet und zunehmend geschädigt, so dass am Ende der Organismus nicht mehr ausreichend mit Blut versorgt werden kann. Bei der Behandlung dieser Klappenfehler wird in der Regel eine chirurgische Wiederherstellung der anatomischen Struktur der Herzklappe angestrebt. Erst wenn dies nicht möglich ist, wird die natürliche Herzklappe durch eine Prothese ersetzt. In Deutschland ist dies jährlich bei ca. 12000 Patienten erforderlich. Als Klappenersatz sind mehrere Alternativen verfügbar: die künstliche Herzklappe aus Metall und Kunststoff, die biologische Prothese aus chemisch modifiziertem tierischen Gewebe (Xenograft) und das vitale menschliche Herzklappentransplantat (Homograft).

Künstliche Herzklappen und Xenografts sind in beliebiger Menge kommerziell verfügbar. Transplantate menschlichen Ursprungs stehen hingegen auf Grund des Spendermangels nur in sehr begrenzter Zahl zur Verfügung.

### **1.2. Herzklappendefekte**

Fehlfunktionen der Klappen können verschiedene Ursachen haben, wobei nur ca. 1% der Klappenerkrankungen auf einer angeborenen Fehlbildung beruht. Der häufigste Grund für Erkrankungen sind Degenerationen bei älteren Menschen. Grundsätzlich kann man zwei Defekte unterscheiden:

Bei der Klappenstenose sind die Herzklappen verengt. Ursachen hierfür sind Kalkablagerungen, auf Grund derer das Klappengewebe sklerosiert, oder Verwachsungen auf Grund rheumatischer oder bakterieller Endokarditis, durch die die Klappensegel oder –taschen anschwellen und miteinander verkleben. Ein anderes Krankheitsbild zeigt sich, wenn die betroffenen Klappensegel oder –taschen nach dem Abklingen der Entzündung schrumpfen oder durch die Entzündung Perforationen im Klappengewebe hervorgerufen werden. Werden die Klappen somit insuffizient, fließt ein Teil des Blutes gegen die normale Fließrichtung zurück und schränkt so die Leistung des Herzens ein.

Ebenfalls häufig ist auch ein sogenanntes kombiniertes Vitium, bei dem eine Klappe beide Defekte aufweist oder mehrere Klappen erkranken. Am häufigsten erkranken Aorten- und Mitralklappe, da sie der höchsten Druckbelastung ausgesetzt sind.

### **1.3. Herzklappenersatz**

In der Regel stellt sich erst im Laufe der Operation heraus, ob eine Klappe rekonstruiert werden kann oder ob sie durch eine Prothese ersetzt werden muss, was v.a. in Aortenposition sehr häufig der Fall ist. Von den 1998 in Deutschland durchgeführten 14287 Herzklappeneingriffen, waren alleine 9068 Eingriffe an der Aortenklappe und 3352 an der Mitralklappe (*Walther und Mohr, 2001*). Dabei konnte in 31,9% der Fälle (davon nur 1,2% in Aortenposition) die erkrankte Herzklappe wiederhergestellt werden, die restlichen Patienten/Patientinnen benötigten eine Herzklappenprothese.

#### **1.3.1. Mechanische Herzklappenprothesen**

Heutige mechanische Herzklappenprothesen besitzen einen äußeren Ring aus synthetischem Gewebe (Dacron oder Teflon), der dazu dient, die Klappe in das Gewebe des Patientenherzens einzunähen, und einen (oder zwei) Kippdeckel aus Metall, der sich im Blutstrom öffnet und schließt. Erstmals wurde eine mechanische Prothese 1960 durch Harken und Starr implantiert, wobei es sich allerdings noch um eine Klappe handelte, bei der eine Metallkugel in einem Metallkäfig gehalten wurde. Diese Klappen hatten sehr schlechte hämodynamische Eigenschaften und deshalb werden in der heutigen Zeit v.a. zwei Varianten verwendet: die Kippscheibenprothese und die Doppelflügelprothese. Mechanischen Herzklappenprothesen besitzen eine Haltbarkeit, die bei 99% der Patienten/Patientinnen deren Lebenserwartung übersteigt (*Butchart et al., 2001*) und sind in allen benötigten Größen problemlos verfügbar. Sie haben jedoch den großen Nachteil, dass der Empfänger lebenslang Antikoagulantien einnehmen muss, da sich sonst an dem körperfremden Material der Prothese Gerinnsel bilden und somit ein hohes Thrombose- und Embolierisiko besteht.

#### **1.3.2. Biologische Herzklappenprothesen**

Es gibt die Möglichkeit, defekte Klappen durch Allografts (Homografts) zu ersetzen. Dabei handelt es sich um menschliche Herzklappen, die entweder von verstorbenen Spendern oder aus explantierten Empfängerherzen im Rahmen der Herztransplantation stammen. Bereits 1965

erfolgte die erste Implantation einer menschlichen Aortenklappe (*Ross, 1965*). Diese Grafts stehen jedoch auf Grund des Spendermangels nur in geringer Anzahl zur Verfügung.

Herzklappenprothesen tierischen Ursprungs (Xenografts) stehen dagegen kommerziell in ausreichender Menge und Größe zur Verfügung und werden sehr häufig als Klappenersatz verwendet. Gebräuchlich sind native Herzklappen vom Schwein oder Klappen, die aus Rinderherzbeuteln hergestellt werden. Die erste porcine Bioprothese wurde 1965 beim Menschen verpflanzt (*Binet et al., 1965*). Damals waren noch alle Xenografts auf ein Klappengerüst (englisch: "stent") aus Kunststoff aufgenäht. Ein solches Gerüst besteht aus flexiblen Pfosten und einem äußeren Ring aus Dacron- oder Teflونغewebe, an dem das Gewebe befestigt wird. Der Stent ermöglicht eine einfachere Implantation, aber er hat den Nachteil, dass er die Öffnungsfläche verkleinert und somit die Leistungsfähigkeit der Klappe vermindert.

Seit 1987 gibt es zusätzlich gerüstfreie biologische Prothesen. Natürliche porcine Herzklappen sind in ihrer Dimension und Anatomie den menschlichen Homografts am ähnlichsten (*Sands et al., 1969*). Bei ihnen entspricht die Öffnungsfläche nahezu der von natürlichen Herzklappen. Allerdings müssen diese Klappen ebenso wie Homografts mit zwei Nahtreihen eingenäht werden und erfordern somit eine deutlich anspruchsvollere chirurgische Technik.

Homografts und gerüstfreie Xenografts zeigen im allgemeinen gute, den gesunden Herzklappen annähernd vergleichbare Blutflusseigenschaften. Deshalb ist das Blutungs- und Thromboserisiko gering und eine langfristige Antikoagulation unnötig. Jedoch ist die Haltbarkeit, besonders bei jüngeren Patienten eingeschränkt. Die durchschnittliche Haltbarkeit von Homografts von 10 bis 20 Jahren (*Barratt-Boyes et al., 1987; Ross et al., 1991; Doty et al., 1998*) liegt etwas über der von Xenografts mit ca. 15 Jahren (*David et al., 1998; Myken et al., 2000; Corbineau et al., 2001; Kirali et al., 2001; Kumar et al., 2003*). Bei Bioprothesen mit Stent kommt es im Gegensatz zu gerüstfreien Bioprothesen bzw. Homografts zu einer starken Beanspruchung des Materials, da am Gerüstring durch den Widerstand im Blutstrom beträchtliche Scherkräfte auftreten (*Schoen et al., 1988*).

Der Vergleich klinischer Daten von biologischen und mechanischen Herzklappenprothesen über einen Zeitraum von bis zu 20 Jahren zeigt, dass der biologische Ersatz besonders bei älteren Patienten keinen Vorteil hinsichtlich der Überlebensrate bringt. Jedoch ist bei diesen Patienten/Patientinnen die Lebensqualität deutlich besser, da die koagulationsbedingten Einschränkungen entfallen und keine Gefahr besteht, an einer durch die Antikoagulation bedingten Blutung zu sterben (*Holper et al., 1995; Sidhu et al., 2001*).

## **1.4. Degeneration biologischer Herzklappen**

### **1.4.1. Mineralisierung**

Ein wichtiger Grund für die limitierte Haltbarkeit der Xenografts liegt in der Mineralisierung des Materials (*Schoen und Levi, 1994; Levi et al., 2003*), die oft eine Reoperation innerhalb von zehn bis fünfzehn Jahren nach der Implantation nötig macht (*Banbury et al., 1998*). Eine Ursache für die Kalzifikation des Gewebes ist die notwendige Fixierung der Bioprothesen. Die unvernetzte extrazelluläre Matrix der Grafts hat ein starkes immunogenes Potential, das rasch zu einem Versagen des implantierten Gewebes führen kann (*Allair et al., 1997*). Damit der Empfänger das fremde, tierische Gewebe nicht abstößt, werden die Klappen in Glutaraldehyd fixiert, denn durch die Vernetzung der Zell- und Matrixmoleküle durch das Glutaraldehyd wird die Antigenität der Bioprothesen stark herab gesetzt (*Nimni et al., 1987*). Die Behandlung mit Glutaraldehyd führt jedoch zu einer vermehrten Kalziumaufnahme der noch verbliebenen Bindegewebszellen der Prothese (*Schoen et al., 1985 und 1986*), was wiederum im Laufe der Zeit ebenfalls zu einem strukturellen Versagen der Klappe führt (*Golomb et al., 1987*). Um dies zu verhindern bzw. den Grad der Kalzifikation möglichst gering zu halten, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen z.T. in Zusammenarbeit mit den Herstellern biologischer Prothesen Antimineralisierungsverfahren getestet (*Moritz et al., 1990; Chen et al., 1994; Girardot et al., 1994; Gott et al., 1997; Zilla et al., 1997; Weissenstein et al., 2000*) und diese finden bei vielen der heutigen Prothesen Verwendung (z.B. Freestyle<sup>®</sup> Bioprothesen von Medtronic Inc., Minneapolis, MN, USA).

### **1.4.2. Immunologische Reaktion**

Außer der Kalzifizierung des Prothesengewebes wird v.a. in den letzten Jahren vermehrt die Vermutung geäußert, dass die Degeneration der Klappen ursächlich auch durch eine immunologische Reaktion des Empfängers auf das fremde Gewebe bewirkt wird. Studien haben gezeigt, dass es ab dem fünften Tag nach der Implantation eines Homografts zu einer deutlichen Erhöhung immunologischer Parameter kommt, nicht jedoch nach der Implantation eines Xenografts (*Schutz et al., 1994; Fischlein et al., 1995*). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass eine durch ein Homograft bewirkte starke humorale Antwort des Patienten zu einem Versagen des Grafts in Abhängigkeit vom initialen Antikörpertiter führen kann (*Welters et al., 2002*). Bei einer Reoperation ist der Patient dann zusätzlich sensibilisiert, was gegebenenfalls zu einem raschen Versagen des zweiten Implantats führt. Weiter wird vermutet, dass die Stimulation von zytotoxischen T-Lymphozyten, die bei 93% der Empfänger von Homografts gemessen wurde, letztendlich zu einer Degeneration der Prothese führen wird, da diese Zellen dafür bekannt sind,

fremdes Gewebe zu erkennen und zu zerstören (*Oei et al., 2000*). Die Immunogenität von Xenografts wird hingegen durch die Vernetzung der Matrixmoleküle durch Glutaraldehyd stark reduziert. In den letzten Jahren wurde jedoch die zur Fixierung der Prothesen eingesetzte Konzentration des Glutaraldehyds reduziert, um den Mineralisierungsvorgang *in vivo* zu minimieren. Dies führt wiederum dazu, dass die Antigene des Materials nicht ausreichend maskiert werden und es im Empfänger vermehrt zu humoralen Reaktionen kommt, die letztendlich wie bei den Homografts zu einem Klappenversagen führen können (*Human und Zilla, 2001*).

### **1.5. Endothelialisierung von biologischen Herzklappenprothesen**

Der Anstieg zirkulierender Antikörper, die gegen die Bioprothese gerichtet sind und die Korrelation zwischen diesen Antikörpern und der Mineralisierung des Prothesengewebes, scheint der immunologischen Reaktion des Empfängerorganismus eine Schlüsselrolle bei der Degeneration biologischer Prothesen einzuräumen (*Vincentelli et al., 1998; Human et al., 1999*). Eine physiologische Schicht aus Endothelzellen könnte einen Schutzschild darstellen, der verhindert, dass die Antigene der Prothese vom Immunsystem des Empfängers erkannt werden (*Trantina-Yates et al., 2001*). Jede native Herzklappe ist von einer konfluenten Endothelzelldecke überzogen. Die Zellen stellen *in vivo* eine effektive und aktive Grenzschicht zwischen Blut und Gewebe dar (*Clark und Finke, 1974*). Endothelzellen spielen u.a. eine entscheidende Rolle bei den antithrombogenen Eigenschaften des Gefäßlumens (*Leather et al., 1985; Hoch et al., 1987*): am nativen, unverletzten Endothel haften weder Thrombozyten, noch Erythrozyten oder Leukozyten (*Harlan, 1985; Esmon, 1987*).

Um die Biokompatibilität und Haltbarkeit der biologischen Prothesen zu verbessern, wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Strategien entwickelt, solche Klappen mit Endothelzellen zu besiedeln. Als Matrix zur Besiedlung dienten, neben unbehandelten Allografts, kommerzielle glutaraldehydfixierte Herzklappenprothesen und porcine Aortengefäßwand- oder Perikardstücke, die nach der Explantation mit enzymatischen und chemischen Reagenzien azellularisiert wurden, um das zurückbleibende Matrixgerüst aus Kollagen, Elastin und Proteoglykanen zu reendothelialisieren.

Es zeigte sich, dass innerhalb von sechs bis zehn Tagen eine konfluente Endothelzellbeschichtung von menschlichen Herzklappen möglich ist (*Eberl et al., 1992*). Ebenso hafteten ovine Zellen an Allografts und überstanden die *in vivo* Situation im Schaf über einige Wochen unbeschadet (*Steinhoff et al., 2000; Trantina-Yates et al., 2001*). Gleiches gilt für ähnliche Versuche im Primatenmodell (*Lehner et al., 1997*).

Während die Besiedlung von unbehandelten Allografts recht vielversprechend war, zeigte sich jedoch, dass die Oberfläche von glutaraldehydfixierten Prothesen für eine dauerhafte Anhaftung von Endothelzellen ungeeignet ist (Eberl et al., 1992; Fischlein et al., 1992; Bengtsson et al., 1993 [1]; Bengtsson et al., 1993[2]; Fischlein et al., 1994; Fischlein und Fasol 1996; Lehner et al., 1997). Für die schlechte Zelladhäsion auf solchen Prothesen wurde eine kontinuierliche Freisetzung von ungebundenem Glutaraldehyd sowie freie Aldehydgruppen auf der porcinen Matrix, die nicht durch kovalente Bindungen abgesättigt waren, verantwortlich gemacht (Fischlein et al., 1992; Hoffmann et al., 1992; Fischlein et al., 1994; Lehner et al., 1997; Fu et al., 1997). Selbst z.T. mehrwöchige Spülungen der Prothesen in phosphatgepufferter Saline brachten nur einen initialen Beschichtungserfolg (Eberl et al., 1992; Fischlein et al., 1992; Bengtsson et al., 1993), denn nach zwei Tagen rundeten sich die Zellen ab und verloren die Adhäsion. Die von mehreren Gruppen durchgeführten Detoxifikationsverfahren mit Urazol (Zilla et al., 1997; Trantina-Yates et al., 2001) oder Glutaminsäure (Fischlein et al., 1992; Bengtsson et al., 1993; Fischlein et al., 1994; Bengtsson et al., 1995; Lehner et al., 1997; Zilla et al., 1997) führte vereinzelt zu einem konfluenten Endothelzellrasen nach siebentägiger Kultivierung, da durch das Senken des pH-Wertes die Polymerisation des Glutaraldehyds reduziert wurde und dies zu einem hohen Anteil von unpolymerisierten, freien Dialdehyden führten, die wasserlöslich und somit auswaschbar waren (Moritz et al., 1990). Bei Bioprothesen mit Stent versagten diese Verfahren jedoch fast immer. Trotzdem scheint der Ansatz, die Oberfläche fixierter Prothesen für eine bessere Zelladhäsion vorzubereiten, richtig zu sein.

## **1.6. Zielsetzung**

Die bisherigen Versuche, die Biokompatibilität von biologischen Prothesen durch die Besiedlung mit Endothelzellen zu verbessern waren v.a. bei den glutaraldehydfixierten Prothesen nicht sehr vielversprechend.

Einerseits ist alternativ behandeltes Material wie z.B. fotooxidiertes Rinderperikard (Bengtsson et al., 1995), mechanisch oder chemisch azellularisiertes porcines Gewebe (Bengtsson et al., 1993; Bader et al., 1998) und Homografts offensichtlich *in vitro* endothelialisierbar, andererseits haben sich mit Glutaraldehyd fixierte Klappen in der breiten klinischen Anwendung bewährt. Es liegt somit nahe auch weiterhin zu versuchen, speziell diese Klappen mit Endothelzellen zu besiedeln, um ihre Biokompatibilität und Antithrombogenität zu verbessern und gleichzeitig ihre Immunogenität und Abnutzung zu verringern.

Ziel dieser Arbeit war also die Zelladhäsion auf solchen Klappen zu verbessern um eine stabile Endothelialisierung zu erreichen. Der Ansatz bestand hierbei in einer Erhöhung der Hydrophilie

des zu beschichtenden Materials, da Zellen über die Bildung von Pseudopodien an hydrophilen Oberflächen adhäreren.

Zusätzlich sollte eine dauerhafte Besiedlung mit vaskulären Endothelzellen dadurch erreicht werden, dass autologe Fibroblasten vor der eigentlichen Endothelialisierung auf das porcine Material aufgebracht wurden, denn schon früher war die Vermutung geäußert worden, dass Endothelzellen lebende Zellen als Untergrund benötigen (*Zünd et al., 1997*) und dass durch eine Besiedlung mit Fibroblasten die Adhäsion von Endothelzellen erhöht wird (*Curtis et al., 1997*).

## MATERIAL

### 2. Material

Soweit nicht anders angegeben, befinden sich die aufgeführten Firmen in Deutschland.

#### 2.1. Reagenzien und Zellkulturmedien

<i><b>Bezeichnung</b></i>	<i><b>Hersteller/Vertreiber</b></i>	<i><b>Katalognummer</b></i>
Aceton	verschiedene	Apotheke, Klinikum Großhadern
Amicacin	Bristol GmbH, München	Apotheke, Klinikum Großhadern
Amphotericin B	Heyden GmbH, München	Apotheke, Klinikum Großhadern
Aqua bidest	verschiedene	Apotheke, Klinikum Großhadern
Ascorbinsäure	Viva GmbH, Köln	7154781
Bovines Serumalbumin (BSA)	Boehringer (Roche), Mannheim	652237
Carcodylsäure (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> AsNaO <sub>2</sub> )	Fluka AG, Buchs, Schweiz	20838
Dimethylsulfoxid	WAK-Chemie, Steinbach	DMSO 10 (10 ml) DMSO 70 (70 ml)
Cyprofloxacin	Bayer AG, Leverkusen	Apotheke, Klinikum Großhadern
Endothelial Cell Growth Medium mit Wachstumsfaktor-Kit	Promocell, Heidelberg	C-22010
Ethanol (30/50/70/96 %)	verschiedene	Apotheke, Klinikum Großhadern
Fibroblast Growth Medium mit Wachstumsfaktor-Kit	Promocell, Heidelberg	C-22030
Foetales Kälberserum (FCS)	Boehringer (Roche), Mannheim	210471
Foetales Kälberserum (FCS)	Biowest, Nuaille, Frankreich	SO2892 bzw. SO2143
Foetales Kälberserum (FCS)	Biochrom/Seromed, Berlin	S 0115/364B
Foetales Kälberserum (FCS)	PromoCell, Heidelberg	C-37350 (# 661 A)
Gentamycin	Life-Technologies/Gibco BRL, Karlsruhe	15750-037
Glutaraldehyd 25 %	Fluka AG, Buchs, Schweiz	R 00806
HCl 1 N	Apotheke, Klinikum Großhadern	L 0306
Heparin	Braun, Melsungen	126/6994
Humanes Serumalbumin 20 % (HSA)	verschiedene	Apotheke, Klinikum Großhadern
Kollagenase II	Cell-Systems (Worthington), Katharinen	LS 04176
M 199 mit Earle Salzen	Biochrom/Seromed, Berlin	F 0615 (500 ml) F 0663 (100 ml)
Methronidazol	Bayer AG, Leverkusen	Apotheke, Klinikum Großhadern

NaCl 0,9 %	verschiedene	Apotheke, Klinikum Großhadern
NaOH, 1 N	verschiedene	Apotheke, Klinikum Großhadern
PBS Dulbecco's	Life-Technologies/Gibco BRL,	L 252 A
PH-Meter-Pufferlösungen: PH 4,01 PH 7,00 PH 10,0	Mettler Toledo GmbH, Steinbach	209863250 209865250 209857250
PKH26 Red (Fluorescent Cell Linker Kit)	Sigma, Deisenhofen b. München	PKH26GL
Ringerlösung	verschiedene	Apotheke, Klinikum Großhadern
Tissue-Tek®	Sakura, Zoeterwonde, NL	4583
Tris	Merck, Darmstadt	1.08382
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma, Deisenhofen b. München	T 8154
Trypsin 0,5 %/0,2 % EDTA in PBS	Life-Technologies/Gibco BRL, Karlsruhe	L 2153
Vancomycin	Lilly GmbH, Gießen	Apotheke, Klinikum Großhadern
Zitronensäure	Merck, Darmstadt	K20352641

## 2.2 Reagenzien und Antikörper für die Immunhistochemie

<b>Primärantikörper</b>		
CD 31 Antikörper (PECAM-1, Maus anti Human)	DAKO, Hamburg	M 0823
Fibroblasten Antikörper (Klon 5B5; Maus anti Human)	DAKO, Hamburg	M 0877
Fibroblasten Antikörper (Klon ASO2; Maus anti Human)	Dianova, Hamburg	DIA 100
Laminin	DPC Biermann, Bad Nauheim	R 1153P
Kollagen IV Antikörper (Maus anti Human)	Sigma, Deisenhofen b. München	C-1926
Schweine Immunglobulin	DAKO, Hamburg	X 0906
Von Willebrand Faktor (Kaninchen anti Human)	DAKO, Hamburg	A 0082
<b>Sekundärantikörper bzw. Detektionssysteme</b>		
Biotin Blocking System	DAKO, Hamburg	X 0590
LSAB2-Kit HRP inkl. AEC	DAKO, Hamburg	K 0672
Schaf anti Maus F(ab') <sub>2</sub> -IgG, Fluorescein (FITC) markiert	Chemicon, Temecula, CA, USA	AQ300F
Ziege anti Kaninchen IgG, Fluorescein (FITC) markiert	Immundiagnostik AG, Bensheim	ZRF1000

<b>Sonstige Reagenzien</b>		
Antikörper-Diluent	DAKO, Hamburg	S 3022
Fluorescencet mounting medium	DAKO, Hamburg	S3023
Mayers Hämalaunlösung	Merk, Darmstadt	1.09249.0500
Tween20	Sigma, Deisenhofen b. München	P-1379

### **2.3. Geräte**

Brutschrank (Heraeus 6000)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Brutschrank (Hera Cell)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Einfriergerät (Kryo 10, Series II)	Messer-Griesheim, Krefeld
Polystar 242 M (Einschweißgerät)	Rische und Herfurth GmbH, Hamburg
Express-Pipette-Aid	Falcon®, Becton-Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, France
Gefrierschrank (-20° C, Comfort Plus)	Siemens, München
Gefrierschrank (-80° C, HFU 86/450)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Kritisch-Punkt-Trockner (CPD 30)	BAL-TEC GmbH, Schalksmühle
Kryostat (Modell 2700 Frigocut)	Reichert-Jung über Leica, Bensheim
Kühlschrank (4 °C, Sikafrost)	Siemens, München
Lamina Airflow (Heraeus, Hera Safe)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Mikroskop (Axiovert 35)	Zeiss, Göttingen
PH-Meter (766)	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Rasterelektronenmikroskop (5420)	Leica, Bensheim
Rotationsinkubator	Eigenkonstruktion, Laborwerkstatt, Klinikum Großhadern, München
Sputter Gerät (SCD 050)	BAL-TEC GmbH, Schalksmühle
Video Copy Processor P66DE	Mitsubishi, Tokio, Japan
Vortex Mixer	Neo Lab, Niederlassung München
Wasserbad (Julabo SW23)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Zentrifuge (Rotina 46 R)	Hettich, Tuttlingen

## **2.4. Verbrauchsmaterial (Einmalartikel, steril und unsteril)**

Cryo Tubes (1,5 ml)	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
Deckgläser (24 x 24 mm)	Roth, Karlsruhe
Einfrierbeutel	Dr. Marx Medizintechnik, München
Farbdiafilm (Elite Chrome 100 und 400)	Kodak GmbH, Stuttgart
Filter (für FCS, 0,2 µm)	Nalgene®, Rochester, NY, USA
Filter (für Glasgefäße, 0,22 µm)	Millex®-GS, Cork, Irland
Filtereinheit (0,2 µm/500 ml)	Nalgene®, Rochester, NY, USA
Gewebekulturplatte (6-well)	Falcon®, Becton-Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, France
Gewebekulturröhrchen (12 ml)	Greiner, Frickenhausen
Kanülen (20G/0,9 mm)	Terumo, Leuven, Belgien
Handschuhe (Biogel SuperSensitiv)	Regent® Medical, Norcross, GA., USA
Kulturschale 12,5 cm <sup>2</sup>	Falcon®, Becton-Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, France
Kulturschale 75 cm <sup>2</sup> und 162 cm <sup>2</sup>	Costar®, Corning Incorporated, Corning, USA
Leit Tabs (12 mm)	Plano, Wetzlar
Mullkompreße (10 x 10 cm)	Braun, Melsungen
Nahtmaterial (Supolene®)	Resorba, Nürnberg
Objektträger (SuperFrost® Plus)	Menzel Gläser, Braunschweig
Petrischale (100 x 20 mm)	Falcon®, Becton-Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, France
Pipetten (5, 10, 25 ml)	Costar®, Corning Incorporated, Corning, USA
Pipettenspitzen (100 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
PP-Röhrchen (30/115 mm; 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
PS-Röhrchen (24,9/90 mm, 30 ml)	Greiner, Frickenhausen
Probenhalter (Ø 12,5 cm)	Plano, Wetzlar
Spritzen (2, 10, 20 ml)	Braun, Melsungen
Spritzen (Perfusor 50 ml)	Braun, Melsungen
Steriles Tuch (SecuDrape®)	Sengwald Klinikprodukte GmbH & Co. KG, Rohrdorf, Thansau
Storagebottle (500 ml)	Costar®, Corning Incorporated, Corning, USA
Tissue Tek® Cryomolds	Miles, Elkhart, Kansas, USA
Verbundhähne	Braun, Melsungen
Videoprinterpapier (Mitsubishi K65HM-CE)	Plano, Wetzlar

## **2.5. Verbrauchsmaterial (wiederverwendbar, autoklavier-/desinfizierbar)**

Anatomische Pinzette	Klinikum Großhadern, München
Gefäßkanüle	Medtronic, Grand Rapids, USA
Glasgefäße (Spezialanfertigung)	Greiner & Gaßner GmbH, München
Lineal	Klinikum Großhadern, München
Lösungsschale (250 ml)	Klinikum Großhadern, München
Neubauer Zählkammer	GLW, Würzburg, Deutschland
Nierenschale	Klinikum Großhadern, München
Plastikbecher (150 und 1000 ml)	Klinikum Großhadern, München
Präparierschere	Klinikum Großhadern, München
Probenhalter für REM-Proben	Probenaufbewahrungsbehälter Plano, Wetzlar
Rotationsinkubator	BAL-TEC GmbH, Schalksmühle Eigenkonstruktion, Laborwerkstatt, Klinikum Großhadern, München

## **2.6. Medienzusammensetzung:**

Wenn nicht anders angegeben wurden die Medien aliquotiert und bei – 20 °C gelagert.

<u>Stoppmedium (500 ml)</u>		<u>Spülmedium (500 ml)</u>	
M199 (1 x)	444 ml	M199 (1 x)	494 ml
Heparin (5000 i. E.)	1 ml	Gentamycin (10 mg/ml)	5 ml
Gentamycin (10 mg/ml)	5 ml	Heparin (5000 i. E.)	1 ml
FCS (EK 20 %)	50 ml		
<u>Humanes Serumalbumin (1%/500 ml)</u>		<u>Trypsin (0,05%)/EDTA (0,02%/500 ml)</u>	
PBS Dulbecco´s Puffer	475 ml	PBS Dulbecco´s Puffer	450 ml
Humanes Serumalbumin (20 %)	25 ml	Trypsin (10 x)	50 ml
<u>Gentamycin (0,01 g/ml bzw. 20%/500 ml)</u>		<u>Bovines Serumalbumin (1%/100 ml)</u>	
PBS Dulbecco´s Puffer	400 ml	PBS Dulbecco´s Puffer	99 ml
Gentamycin (50 mg/ml)	100 ml	BSA	1 ml
<u>Fix II (500 ml)</u>		<u>Glutaraldehyd (0,2%/500 ml)</u>	
Aqua bidest	456 ml	PBS Dulbecco´s Puffer	496 ml
Glutaraldehyd (25 %)	43,5 ml	Glutaraldehyd (25 %)	4 ml
HCl (1N)	0,75 ml	Lagerung bei 4 °C	
Na-CaCO	5,65 g		
Lagerung bei 4 °C			

<u>Antibiotikacocktail (100 ml)</u> M199 100 ml Amicacin 2 mg Amphotericin B 0,5 mg Cyprofloxacin 3 mg Methronidazol 2 mg Vancomycin 2 mg Frische Zubereitung; Antibiotika bzw. Fungizide wurden bei – 20 °C gelagert, M199 bei 4 °C.	<u>Einfrriermedium (10% DMSO-Lösung/111,3 ml)</u> M199 100 ml DMSO 11,3 ml <hr/> <u>Kollagenase II-Lösung (0,1%/10 ml)</u> Humanes Serumalbumin (1%) 10 ml Kollagenase II (269 – 276 U) 10 mg Frische Zubereitung; HSA wurde bei – 20 °C gelagert, Kollagenase II bei 4 °C.
<u>Kulturmedium für Endothelzellen (10% FCS/500 ml)</u> Endothelial Cell Growth Medium 450 ml FCS (steril filtriert) 50 ml Wachstumsfaktor-Kit 10 ml Frische Zubereitung; Lagerung bis drei Wochen bei 4 °C möglich	<u>Kulturmedium für Fibroblasten (20 bzw. 30% FCS/500 ml)</u> Fibroblast Growth Medium 400/350 ml FCS (steril filtriert) 100/150 ml Wachstumsfaktor-Kit 10 ml Frische Zubereitung; Lagerung bis drei Wochen bei 4 °C möglich
<u>H2O2-Lösung (0,01%/200 ml)</u> PBS 200 ml H2O2 20 µl Frische Zubereitung	<u>Tris-Tween20 Puffer (1000 ml)</u> Tris (50 mM) 6,06 g/l NaCl (300 mM) 17,53 g/l Tween20 (0,1 %) 1 ml Aqua bidest 1000 ml pH auf 7,6 eingestellt (vor Tween20-Zugabe)
<u>Ascorbin- bzw. Zitronensäure (5, 10, 15%/200 ml)</u> H2O (Aqua bidest) 190/180/170 ml Säure (Pulver, w/v) 10/20/30 g Frische Zubereitung	<u>Hämalaunlösung (20%/10 ml)</u> H2O (Aqua bidest) 10 ml Mayers Hämalaunlösung 2 ml Frische Zubereitung

## **2.7. Biologisches Material**

### **2.7.1. Vena saphena magna für die Gewinnung von Fibroblasten- und Endothelzell-primärkulturen**

Die Venen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren Reste aus koronaren Bypass-Operationen, die in der Abteilung für Herzchirurgie durchgeführt wurden. Die Spender/innen hatten ihr Einverständnis gegeben, dass die Venenstücke im Rahmen von *in vitro* Studien verarbeitet werden durften. Die Zeitspanne zwischen Entnahme und Verarbeitung der Vene lag je nach Freigabe zwischen 0 und 2 Tagen. Es wurden insgesamt 60 Venen mit einer durchschnittlichen Länge von  $13,3 \pm 5,7$  cm verarbeitet.

### **2.7.2. Schweineherzklappen**

Bei den verwendeten Schweineherzklappen (SKL) handelte es sich um insgesamt 25 Aorten- und Pulmonalklappen mit jeweils 2,5 bis 4 cm Gefäßwandlänge und 21 bis 23 mm Gefäßdurchmesser, die aus Schweineherzen entnommen wurden, die vom örtlichen Schlachthof (Zenettistraße, München) zur Verfügung gestellt worden waren. Ein Teil der SKL wurde für Vorversuche verwendet, wobei die Gefäßwand und zum Teil die Segel in Stücke (Patches) von 1 bis 4 cm<sup>2</sup> zerlegt wurden. Teilweise wurden die Patches auch von Klappen gewonnen, die als Ganzes in den Versuch kamen, wobei ein ca. 1 cm breiter Gefäßwandring abgetrennt wurde.

Die im folgenden benutzte Nomenklatur der SKL bezieht sich auf die Reihenfolge im Versuch. Darüber hinaus ist die Nummerierung der Klappen bei der primären Präparation (Methoden 3.2.) angegeben, da die in dieser Arbeit gezeigten Bilder mit diesen Bezeichnungen versehen sind. Die zu beschichtende Oberfläche der SKL berechnete sich aus der Mantelfläche eines Zylinders  $2 \cdot \pi \cdot r \cdot h$  ( $r$  = Gefäßradius,  $h$  = Gefäßwandhöhe) und der Oberfläche der Segel. Diese wurden exemplarisch an drei Klappen mit 21, 22 und 23 mm Durchmesser vermessen. Hierzu wurden die Klappen aufgeschnitten, die Segel herausgetrennt und deren Größe mit einem Lineal festgestellt. Der jeweilige Wert wurde zur Mantelfläche der entsprechend großen Klappe addiert. In Tabelle 1 sind die als Ganzes verwendeten SKL zusammengefasst. Die Einteilung in Gruppen erfolgte auf Grund der Vorbehandlung der Klappen (Methoden 3.3.2.).

Tab. 1: Übersicht über die als Ganzes verwendeten SKL:

A = Aortenklappe; P = Pulmonalklappe

Nummerierung im Versuch	Bezeichnung im Labor	Fläche in cm <sup>2</sup>	Gruppe	Versuch
SKL 1	1 A	31,4	B	4.2.2.1.
SKL 2	29 P	33	B	
SKL 3	13 A	33	L	
SKL 4	24 P	36,2	L	
SKL 5	24 A	41,4	F	
SKL 6	17 P	36,2	F	
SKL 7	23 A	34,5	M	
SKL 8	21 P	34,5	M	
SKL 9	27 A	32,5	H	4.2.2.2.
SKL 10	23 P	34,5	H	
SKL 11	30 P	34,5	H	
SKL 12	15 A	41,4	O	
SKL 13	20 A	41,4	O	
SKL 14	22 A	33	O	
SKL 15	28 A	34,5	O/P	
SKL 16	30 A	41,4	O	
SKL 17	25 P	34,5	O	4.2.2.3.
SKL 18	26 P	36,2	P	

### **2.7.3. Porcine Bioprothesen der Firma Medtronic**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten porcinen Bioprothesen, deren Mindesthaltbarkeitsdatum überschritten war, wurden freundlicherweise von der Firma Medtronic Inc. (Minneapolis, Minn., USA) zur Verfügung gestellt. Ein Teil der verwendeten Prothesen bestand nur aus den porcinen Segeln, die auf einem flexiblen Spannrahmen (Stent) aus Acetalpolymerisat angebracht und befestigt waren. Zur Verwendung kamen hier Mosaic® Bioprothesen (Abb. 1A) des Typs 505 (Aortenklappe) und 310 bzw. 510 (Mitralklappe).

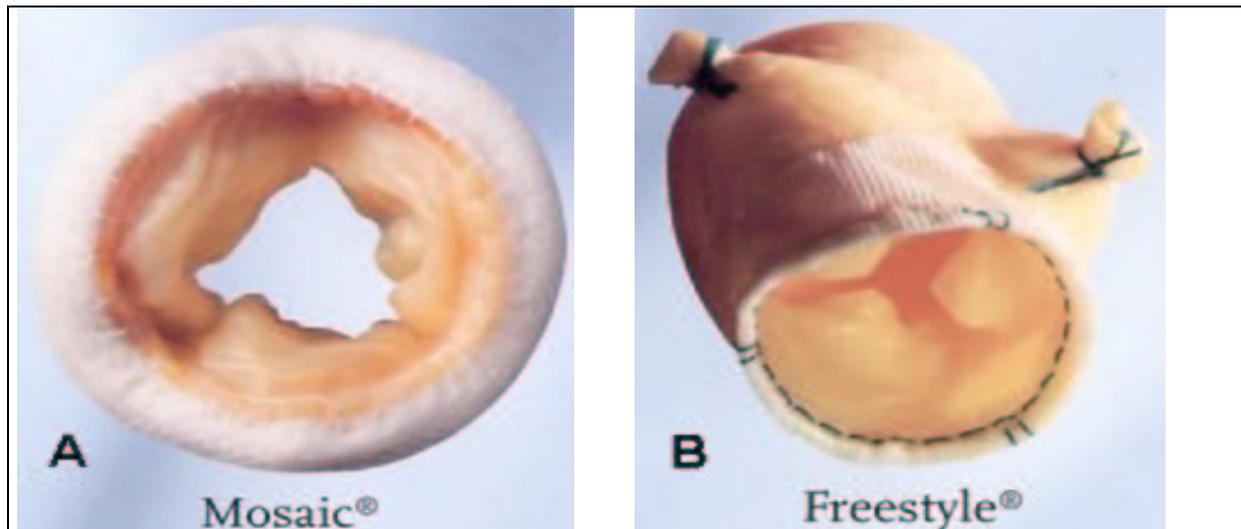


Abb. 1 Bioprothesen der Firma Medtronic: Mosaic® Bioprothese mit Spannrahmen (A), Freestyle® Prothese mit Aortenwurzel (B)

Der andere Teil der verwendeten Klappen bestand aus Freestyle® Bioprothesen des Modells #995. Hierbei handelte es sich um Schweine-Aortenherzklappen, bei denen die Segel noch in ihre natürliche Umgebung, der Aortenwurzel, eingebettet waren, womit die Notwendigkeit eines Trägergerüsts entfiel. Die Aortenwand enthielt die Koronararterienabgänge und Reste des Myokards wurden durch ein Polyestergerüst abgedeckt (Abb. 1B). Die zu beschichtende Oberfläche wurde analog zu den SKL berechnet (Material 2.7.2). Da aber nur eine begrenzte Anzahl von Bioprothesen zur Verfügung stand, wurden zur Berechnung der Segeloberfläche die Segel von entsprechend großen SKL mit 19, 21, 23 und 31 mm Gefäßdurchmesser vermessen und die Daten übertragen. In Tabelle 2 sind die als Ganzes verwendeten Bioprothesen zusammengestellt. Die Gruppeneinteilung erfolgte auf Grund der Vorbehandlung, der die jeweilige Klappe unterzogen wurde (Methoden 3.3.2.).

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Mosaic® und Freestyle® Bioprothesen

<b>Nummerierung im Versuch</b>	<b>Bioprothese: Modell und Seriennummer (Bezeichnung im Labor)</b>	<b>Fläche in cm<sup>2</sup></b>	<b>Gruppe</b>	<b>Versuch</b>
Med-5	Mosaic® T510/Mitral 21M21368	13,2	M	4.3.2.1.
Med-6	Mosaic® T505/Aorta 29A313589I	18,2	F	
Med-1	Mosaic® T510/Mitral 29M15472	18,2	O	4.3.2.2.
Med-2	Mosaic® II T510/Mitral 29M17149	18,2	O	
Med-7	Mosaic® II T310/Mitral 31M601306	19,5	O	
Med-3	Freestyle® #995 23N706317I	36,2	O	4.3.3.
Med-4	Freestyle® #995 21N702705I	33,0	O	
Med-9	Freestyle® #995 19N001542I	29,8	O	
Med-10	Freestyle® #995 27N714534I	42,4	O	
Med-11	Freestyle® #995 23N71691I	36,2	O	
Med-12	Freestyle® #995 21N001386I	33,0	O	

# METHODEN

## **3. Methoden**

### **3.1. Zellkultur**

#### **3.1.1. Allgemeine Bedingungen**

Alle Arbeitsschritte im offenen System wurden an einer sterilen Werkbank (Material 2.3.) durchgeführt. Die Brutschrankbedingungen waren konstant bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und 95% Luftfeuchtigkeit. Zentrifugation erfolgte, wenn nicht anders angegeben, für 10 Minuten bei 4 °C, 250 x g und leichter Bremse. Die Verarbeitung der Venen und der Herzklappen geschah unter sterilen Kautelen.

#### **3.1.2. Zellgewinnung**

Die für die Beschichtung benötigten Zellen wurden aus der *Vena saphena magna* gewonnen (Fischlein et al., 1994; Deutsch et al., 1997). Zum Transport vom OP ins Zelllabor und zur Aufbewahrung bis zur Zellgewinnung wurden die Venen in steriles M199 (4 °C) gelegt. Bei der im folgenden beschriebenen Methode handelte es sich um ein auf die Bedürfnisse dieser Arbeit angepasstes Verfahren, das ähnlich bereits beschrieben worden war (Sharefkin et al., 1986; Zilla et al., 1990; Heagerstrand et al., 1992; Fischlein et al., 1994; Stansby et al., 1994; Deutsch et al., 1997; Johnson et al., 1997). Die Venen wurden beidseitig mit Venenkanülen, die mit Nahtmaterial fixiert wurden, kanüliert und die Kanülen mit Verbundhähnen versehen. Über diese wurden die Venen mittels einer 20 ml Spritze mit 15 ml 37 °C warmen Spülmedium (Material 2.6.) durchspült. Dadurch wurden Erythrozyten und Plaques gelöst und entfernt. Anschließend wurde das Venenlumen mit 0,1% Kollagenase II-Lösung (Material 2.6.) inkubiert, indem vor Zugabe der Lösung ein Verbundhahn und nach der Zugabe der zweite verschlossen wurde. Die Venen wurden in 37 °C warme phosphatgepufferte Saline (Dulbecco's PBS ohne Mg<sup>++</sup> und Ca<sup>++</sup>) gelegt (Abb. 2A) und 20 Min im Brutschrank inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 20 ml 4 °C kaltem Stoppmedium (Material 2.6.) beendet, wobei die dabei gewonnene Fraktion in 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen (Abb. 2B) und zentrifugiert wurde. Das Zellpellet wurde in 6 ml Kulturmedium für Endothelzellen, dem 10% fötales Kälberserum (FCS) zugegeben wurde, resuspendiert und in 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit belüftetem Deckel ausgesät.

Die Fibroblastengewinnung erfolgte direkt im Anschluss analog zur Endothelzellgewinnung. Um die notwendige Zellmenge für eine Primärkultur zu erhalten, wurden die Venen anfänglich durch zweimalige zwanzigminütige Inkubation mit Kollagenase II gewonnen. Später wurde eine dreimalige dreißigminütige Inkubation nötig, da durch einen herstellerbedingten Wechsel des verwendeten FCS eine höhere initiale Zellzahl zur erfolgreichen Kultivierung nötig wurde. Die Fibroblasten-Primärkultur wurde in Kulturmedium für Fibroblasten, dem anfänglich 20%, später 30% FCS zugegeben wurde, angelegt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte nach allgemein gängigen Zellkulturmethoden (*Lindl, 2000*) die den Bedürfnissen der Zellen angepasst wurden (*Fridman et al., 1985; Thompson et al., 1993; Johnson et al., 1997; Malassagne et al., 1998; Simon et al., 1998*). Der Mediumwechsel erfolgte mit den angegebenen Kulturmedien alle zwei bis drei Tage.

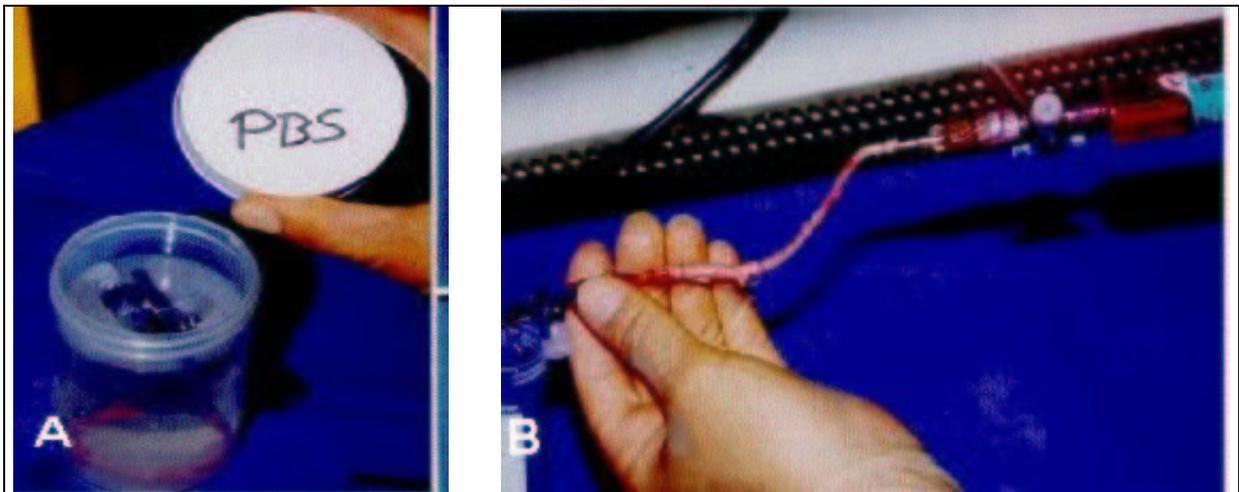


Abb. 2 Verarbeitung der *Vena saphena magna*: Inkubation der Vene mit Kollagenase II in einem Becher mit PBS (A), Herausspülen der Zellsuspension mit Stoppmedium nach der Kollagenaseinkubation (B)

### 3.1.3. Trypsinieren und Passagieren der Zellen

Zunächst wurde das Kulturmedium aus Kulturflaschen mit konfluenten Zellen abgezogen und die Kultur kurz mit PBS gespült, um Reste des FCS-haltigen Mediums zu entfernen, welches die Wirkung des Trypsins beeinträchtigt hätte. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5% Trypsin/0,02% EDTA-Lösung (37 °C) vom Flaschenboden abgelöst, wobei soviel Reagenz zugegeben wurde, dass die gesamte Bodenfläche gut benetzt war. Durchschnittlich wurden die 12,5, 75 bzw. 162 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit jeweils 2, 5 bzw. 10 ml Trypsin inkubiert. Die Reaktion wurde zwischendurch im Phasenkontrastmikroskop (PKM) überprüft und mit dem jeweils doppelten Volumen Stoppmedium (Material 2.6.) beendet, sobald die Zellen im

Medium suspendiert waren. Danach wurde die Zellsuspension in 50 ml PP-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend im entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und in neuen Kulturflaschen inkubiert. Die Vermehrung erfolgte in folgenden Schritten:  $12,5 \text{ cm}^2 \rightarrow 75 \text{ cm}^2 \rightarrow 162 \text{ cm}^2 \rightarrow 3 \times 162 \text{ cm}^2 \rightarrow 6 \times 162 \text{ cm}^2 \rightarrow 12 \times 162 \text{ cm}^2$ , so dass die Lebendzellzahl nach dem Trypsinieren der sechsten Passage durchschnittlich bei  $2,7 \pm 1,5 \times 10^7$  Fibroblasten ( $n = 25$ ) bzw.  $4,7 \pm 3,2 \times 10^7$  Endothelzellen ( $n = 31$ ) lag. Die sechste Passage war nach durchschnittlich  $42 \pm 9$  Tagen erreicht, wobei die Endothelzellen, die nach den autologen Fibroblasten ebenfalls verwendet wurden, 7 Tage länger konfluent in den Kulturschalen verblieben oder erneut passagiert wurden, um ein Ablösen der Zellen durch Überkonfluenz zu verhindern. So ergab sich eine durchschnittliche Kulturdauer von  $48 \pm 9$  Tagen.

#### **3.1.4. Bestimmung der Lebendzellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Diese wurde durch Aufbringen des Deckglases auf eine definierte Tiefe von 0,1 mm eingestellt. Um eine Vitalfärbung durchzuführen, wurden 30  $\mu\text{l}$  der resuspendierten Zellsuspension mit einer 0,4% Trypanblau-Lösung 1 : 1 gemischt und sofort in die Kammer gefüllt. Dazu wurde die Pipettenspitze so an der Kammer angesetzt, dass die Kapillarkräfte der Kammer die Suspension von selbst hinein zogen. Vitale Zellen der gefärbten Suspension erschienen im PKM weiß, tote hingegen blau, da bei diesen die Zellmembran porös war und so der Farbstoff aufgenommen wurde. Es wurden acht große Quadrate der Zählkammer ausgezählt, der Mittelwert ermittelt und eine Multiplikation dieses Wertes mit der Formel  $\text{Zellzahl} \times 2 \times \text{ml Zellsuspension} \times 10^4$  ergab die Gesamtzellzahl der untersuchten Kultur. Die Zahl 2 gab den Verdünnungsfaktor an. Die Auszählung der blau gefärbten Zellen ergab den Anteil an toten Zellen der Gesamtzellmenge.

#### **3.1.5. Intravitalfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26**

PKH26 ist ein in die Zellmembran integrierender, aliphatischer Fluoreszenzfarbstoff (*Horan und Sleszak, 1989*). Die *in vivo* ermittelte Halbwertszeit der Fluoreszenz beträgt mehr als 100 Tage bei roten Blutzellen von Kaninchen und somit zählt PKH26 zu den stabilen Fluoreszenzfarbstoffen. Die Färbung von humanen Endothelzellen bzw. Fibroblasten mit dem PKH26 Fluorescent Cell Linker Kit wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Die zu färbenden Zellen wurden trypsinisiert, vereint und anschließend in 50 ml M199 gewaschen, um

FCS zu entfernen, da dieses die Reaktion störte. Das Zellpellet wurde in 1 ml Diluent C aus dem Kit resuspendiert und anschließend mit 1 ml Diluent C, dem 4 µl PKH26-Farbstoff/2 x 10<sup>7</sup> Zellen zugegeben wurde, 3 Min mit einer 5-ml-Pipette vorsichtig gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml 1% BSA (Material 2.6.) beendet. Um ungebundenen Farbstoff zu entfernen, wurden die Zellen viermal mit je 10 ml Kulturmedium gewaschen (Zentrifugation bei 200 x g). Am Schluss wurden die Zellen auf die gleiche Anzahl Kulturschalen ausgesät, wie vorab für die Färbung trypsiniert worden waren. Die Färbung konnte bei einer Wellenlänge von 560 nm im PKM überprüft werden.

### **3.2. Vorbereitung von Schweineherzklappen**

#### **3.2.1. Präparation**

Die zur Präparation der SKL benötigten Herzen wurden vom Schlachthof München zur Verfügung gestellt (Material 2.7.2.). Nach der Entnahme eines Herzens wurde es in einen sterilen Plastikbecher mit kalter Ringerlösung gelegt und gekühlt sofort in die Klinik gebracht. Dort wurden Aorta und Pulmonalis von frei gelegt, der Durchmesser der Gefäße mit einem Hegar-Stift gemessen und die Klappen für 7 Tage in einem Antibiotika/Mykotika-Cocktail (AB-Cocktail, Material 2.6.) bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Klappen eingefroren (Methoden 3.2.2.) oder sofort in 0,2% GA-Lösung (Material 2.6.) überführt und bei 4 °C gelagert (Methoden 3.2.4.).

#### **3.2.2. Kryopräservierung**

Bis auf zwei Klappen (SKL 15 und 18) wurden alle verwendeten SKL kryopräserviert. Hierzu wurde die jeweilige Klappe aus dem AB-Cocktail (Material 2.6.) entnommen, in Ringerlösung eingelegt und darin gespült. Die Klappe wurde anschließend aus der Ringerlösung entnommen und in eine Mullkompressen gelegt (10 x 10 cm), die wiederum in einen Herzklappen-Aufbewahrungsbeutel (Material 2.4.) gelegt und mit Einfriermedium (Material 2.6.) gefüllt wurde. Der Beutel wurde verschweißt und in insgesamt zwei weitere sterile Beutel eingeschweißt. Die Kryopräservierung erfolgte in einem Einfriergerät (Material 2.3.), das die Klappe kontrolliert und unter schneller Abgabe der kritischen Kristallisationswärme auf -80 °C kühlt, um die Entstehung von Eiskristallen zu verhindern. Dies hätte sonst das Gewebe porös gemacht. Anschließend erfolgte die Lagerung der Klappe in flüssigen Stickstoff (-196 °C) über mindestens 7 Tage.

### **3.2.3. Auftauen**

Um die kryopräservierten Klappen verwenden zu können, mussten sie zuerst aufgetaut werden. Hierzu wurde die jeweilige Klappe aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Einfrierbeutel sofort in eine Metallschale mit 45 °C warmer Ringerlösung gelegt bis das Einfriermedium aufgetaut war. Anschließend wurde die Klappe mitsamt der Mullkompressen aus dem Beutel genommen, erneut in Ringerlösung gelegt, dort von der Kompressen befreit und die Klappe in frisches Medium eingelegt. Schließlich wurde die Klappe in 0,2% GA (Material 2.6.) fixiert und bei 4 °C gelagert.

### **3.2.4. Fixierung**

Alle Herzklappen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren mindestens 7 Tage bei 4 °C in 0,2% GA (Material 2.6.) fixiert worden. Hierzu wurden die SKL jeweils in einen Plastikbecher, der mit 200 ml der GA-Lösung gefüllt war, gelegt. Die verwendeten Bioprothesen (Material 2.7.3.) waren vom Hersteller in 0,2% GA fixiert und mit Alphaamino-Ölsäure (AOA) behandelt worden.

## **3.3. Vorbehandlung von fixierten Schweineherzklappen und Bioprothesen**

### **3.3.1. Spülung und Säurebehandlung**

Um GA-fixierte SKL und Bioprothesen zu spülen bzw. mit Säure zu behandeln, wurde mit dem Material nach der Entnahme aus dem GA und vor der Besiedelung mit humanen Zellen wie folgt verfahren: Das Material wurde in einen Plastikbecher, der mit 200 ml der entsprechenden Spüllösung (NaCl, PBS, M199) gefüllt war (Methoden 3.3.2.), gelegt und darin 10 Min oder 24 h inkubiert. Die 24-stündige Inkubationszeit erfolgte 3 h im Brutschrank, 19 h bei 4 °C und zum Erwärmen des Materials vor der Besiedelung erneut für ca. 2 h bei 37 °C. Die 10-minütige Inkubation erfolgte nur im Brutschrank. Wurden nur Teile (Patches) von Klappen verwendet, wurden große Bereiche (Ringe) der Gefäßwand mit einer Schere herausgetrennt und als Ganzes vorbehandelt. Erst anschließend wurden die Patches in der benötigten Größe und Menge zurecht geschnitten.

Wurde vor der Spülung eine Säurebehandlung durchgeführt, wurde Patchmaterial kurz, ganze Klappen hingegen für 30 Min in 200 ml PBS gespült, um ungebundenes GA zu entfernen. Insbesondere die GA-Reste, die sich in den Segeltaschen angesammelt hatten, mussten sorgfältig ausgespült werden.

Anschließend wurde das Material in einen Becher gelegt, in dem sich 200 ml 5, 10 bzw. 15% ZS bzw. AS (Material 2.6.) befand und darin 5 Min inkubiert. Darauf folgte eine 10-minütige Inkubation in einem neuen Becher mit 200 ml Aqua bidest um ungebundene Säure zu entfernen. Es folgte eine Spülung in M199, das so oft erneuert wurde, bis kein Farbumschlag des im Medium enthaltenen Indikators Phenolrot mehr erfolgte. Phenolrot hat bei einem physiologischen pH von 7,4 einen purpurroten Farbton, der mit abnehmendem pH zu gelb wechselt (pH unter 6,8). Neben der optischen Beurteilung, wurde außerdem eine Messung am pH-Meter durchgeführt, indem 20 ml des Inkubationsmediums aus dem Becher entnommen und untersucht wurde. Nachdem wieder ein pH von 7,4 erreicht worden war, wurde das Material in frisches M199 überführt und insgesamt 24 h inkubiert (siehe oben).

### **3.3.2. Gruppeneinteilung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob GA-fixiertes porcines Material nach unterschiedlicher Vorbehandlung endothelialisierbar ist. Zunächst wurden Patches und/oder ganze SKL und Bioprothesen unterschiedlichen Spülungen unterzogen (Methoden 3.3.1.).

Außerdem wurde untersucht, ob zusätzlich zur Spülung eine Behandlung mit AS bzw. ZS das porcine Klappenmaterial für Endothelzellen beschichtbar macht. Hierzu wurde ein Teil des verwendeten Materials mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen der jeweiligen Säure inkubiert (Methoden 3.3.1.).

Schließlich wurden Patches und ganze Klappen vor der Endothelialisierung mit autologen Fibroblasten besiedelt. Es sollte untersucht werden, ob eine Vorbesiedelung mit Fibroblasten die Adhärenz der Endothelzellen über einen längeren Zeitraum verbessert.

Das zur Zellbesiedelung verwendete porcine Material wurde schließlich in 16 Gruppen unterteilt, wobei alle verwendeten SKL der Gruppen A bis O vor der Behandlung kryopräserviert worden waren:

- Gruppe A wurde nach der Fixierung ohne weitere Behandlung mit Endothelzellen besiedelt. Aus dieser Gruppe wurden nur SKL-Patches verwendet.
- Gruppe B wurde für 10 Min in physiologische NaCl-Lösung (0,9%) gelegt und anschließend mit Endothelzellen inkubiert. Neben SKL-Patches wurden zwei Herzklappen (SKL 1 und 2) verwendet.
- Gruppe C wurde 24 h in 0,9% NaCl inkubiert und anschließend mit Endothelzellen beschichtet. Es wurden nur SKL-Patches verwendet.

- Gruppe D wurde 24 h in PBS inkubiert und anschließend mit Endothelzellen beschichtet. Es wurden nur SKL-Patches untersucht.
- Gruppe E erfuhr eine 10-minütige Spülung in M199, bevor Endothelzellen aufgebracht wurden. Es wurden nur SKL-Patches verwendet.
- Gruppe F wurde 24 h in M199 inkubiert und mit Endothelzellen beschichtet. Verwendet wurden SKL-Patches, SKL 5, 6 und Med-6.
- Gruppe G wurde vor der 24-stündigen Spülung in M199 mit 5% AS oder ZS (Material 2.6.) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Spülung in Aqua bidest für 10 Min. Auf das Material (SKL Patches) wurden Endothelzellen aufgebracht.
- Gruppe H wurde analog zu Gruppe G behandelt, wobei die Säurekonzentration bei 10% lag (Material 2.6.). Außer Patches von SKL und Bioprothesen wurden auch drei Herzklappen (SKL 9, 10 und 11) nach diesem Schema behandelt.
- Gruppe I wurde wie Gruppe G behandelt. Die Säurekonzentration betrug 15% (Material 2.6.). Es wurden ausschließlich SKL-Patches verwendet.
- Gruppe J und K wurden wie Gruppe H vorbehandelt. Gruppe J wurde anschließend mit PKH-26-gefärbten Endothelzellen besiedelt und Gruppe K mit gefärbten Fibroblasten (Methoden 3.1.5.).
- Gruppe L wurde wie Gruppe B vorbehandelt. Die verwendeten SKL (SKL 3 und 4) wurden jedoch 7 Tage vor dem Auftrag der Endothelzellen mit autologen Fibroblasten beschichtet.
- Gruppe M wurde wie Gruppe F vorbehandelt. Drei Klappen (SKL 7, 8 und Med-5) wurden nach der Spülung erst mit Fibroblasten und 7 Tage später mit Endothelzellen beschichtet.
- Gruppe N wurde wie Gruppe H vorbehandelt, jedoch wurde ausschließlich AS verwendet. Vor den Endothelzellen wurden auf den verwendeten SKL- und Bioprothesen-Patches Fibroblasten aufgetragen.
- Gruppe O wurde analog zu Gruppe N vorbehandelt, allerdings wurde ZS verwendet. Auf Grund der im Laufe dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse stammten die meisten der untersuchten Klappen (SKL 12 bis 18, Med-1 bis 4 und 9 bis 12) aus dieser Gruppe.
- Gruppe P entspricht Gruppe O, jedoch wurden die zwei SKL dieser Gruppe (SKL 15 und 18) vor der Beschichtung nicht kryopräserviert.

Eine Übersicht der verwendeten Gruppen ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tab. 3: Gruppeneinteilung des porcinen Materials auf Grund seiner Vorbehandlung

Gruppe	Vorbehandlung				Beschichtung	
	Säure	Konzentration	Spülung	Dauer	Endothelzellen	Fibroblasten
A	—	—	—	—	+	—
B	—	—	NaCl	10 Min	+	—
C	—	—	NaCl	24 h	+	—
D	—	—	PBS	24 h	+	—
E	—	—	M199	10 Min	+	—
F	—	—	M199	24 h	+	—
G	ZS/AS	5%	M199	24 h	+	—
H	ZS/AS	10%	M199	24 h	+	—
I	ZS/AS	15%	M199	24 h	+	—
J	ZS	10%	M199	24 h	PKH26-gefärbt	—
K	ZS	10%	M199	24 h	—	PKH26-gefärbt
L	—	—	NaCl	10 Min	+	+
M	—	—	M199	24 h	+	+
N	AS	10%	M199	24 h	+	+
O	ZS	10%	M199	24 h	+	+
P	ZS	10%	M199	24 h	+	+

### **3.4. Probenaufbereitung für das Rasterelektronenmikroskop**

#### **3.4.1. Fixierung**

Proben für das Rasterelektronenmikroskop (REM) wurden nach der Entnahme sofort in ein PP-Röhrchen mit Fix II (Material 2.6.) überführt und darin mindestens 24 h bei 4 °C fixiert. Bis zur weiteren Aufbereitung konnten die Proben bei 4 °C gelagert werden.

### **3.4.2. Aufsteigende Alkoholreihe**

Da im REM ein Vakuum aufgebaut wird, mussten die Proben komplett entwässert werden, um das Sieden des in den Proben enthaltenen Wassers zu verhindern. Deshalb wurden die Proben zunächst in einen Probenhalter (Material 2.5.) gelegt und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt (*Hormia et al., 1983; Thompson et al., 1993; Tsuchida et al., 1996*). Bei dieser wurden die Proben jeweils 10 Min bei RT in 30, 50, 70 und 96% Ethanol inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation in einem 1 : 1 Gemisch aus 96% Ethanol und 100% Aceton und letztendlich die Überführung in -20 °C kaltes, reines Aceton, das auch als Transportmedium des Probenhalters zum Kritisch-Punkt-Trockner (Material 2.3.) diente.

### **3.4.3. Kritisch-Punkt-Trocknen**

Der Probenhalter wurde in die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockner (Material 2.3.) gestellt, die vorher mit kaltem Aceton gefüllt worden war (*Hoffman et al., 1992; Thompson et al., 1993; Tsuchida et al., 1996; Deutsch et al., 1997*). Danach wurde die Kammer verschlossen, auf 8 °C gekühlt und das Aceton in mehreren Schritten gegen CO<sub>2</sub> ausgetauscht. Anschließend wurde die Kammer auf 42 °C erwärmt. Bei einer Temperatur von 31 °C und einem Druck von 73,8 bar war der kritische Punkt für CO<sub>2</sub> erreicht und es ging vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand über. Hierbei wurden die Proben in der Kammer getrocknet. Temperatur und Druck wurden nach Herstellerangaben deshalb weiter erhöht, um Feuchtigkeitseffekte bei zu schnellem Gasablassen zu vermeiden. Das Gas wurde über einen Zeitraum von ca. 45 Min kontrolliert und langsam über ein Ventil abgelassen. Anschließend konnten die Proben entnommen werden. Sie wurden auf Probentellern befestigt, die zuvor mit einer speziellen Leitfolie (Material 2.4.) beklebt worden waren.

### **3.4.4. Gold-Palladium Sputtern**

Um die Leitfähigkeit herzustellen mussten die getrockneten Proben mit einer dünnen Schicht Gold-Palladium belegt werden (*Hoffman et al., 1992; Liao et al., 1993; Thompson et al., 1993; Tsuchida et al., 1996*). Hierzu wurden die Probenteller mit den Proben in die Kammer des Sputtergeräts (Material 2.3.) gesteckt und die Luft innerhalb der Kammer gegen Argon ausgetauscht. Dann wurden die Proben 180 Sekunden lang mit Gold bedampft. Nachdem das Argon über ein Ventil entlüftet wurde konnten die Proben entnommen werden.

### **3.4.5. Rasterelektronenmikroskopie**

Die beschichteten Proben wurden an einem Rasterelektronenmikroskop (Material 2.3.) untersucht (*Plattner und Zingsheim, 1987*). Hierzu wurden die Probenhalter im Probenhalter der Vakuumkammer des Geräts fixiert und anschließend das Vakuum aufgebaut. Die Bilddarstellung erfolgte am Computer und über Ausdrücke auf Thermopapier am Videoprinter (Material 2.3.).

## **3.5. Vorbereitung von Zellen bzw. Gewebe für Untersuchungen am Phasenkontrastmikroskop**

### **3.5.1. Zellen**

Die zu untersuchenden Zellen wurden trypsinisiert (Methoden 3.1.3.), in Füttermedium aufgenommen und auf sterile Super Frost Plus Objektträger (OT) ausgesät. Diese wurden in einer Petrischalen mit Füttermedium 24 – 72 h bis zur gewünschten Zelldichte im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die OT entnommen und immunhistochemisch (Methoden 3.6.) behandelt.

### **3.5.2. Gewebestücke (Patches)**

Die jeweilige Probe (Wand oder Segelprobe einer Schweineherzklappe oder Bioprothese) wurde direkt nach der Entnahme in ein Kryogefäß gelegt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnte anschließend bis zur Herstellung von Gefrierschnitten (Methoden 3.5.3.) bei  $-80\text{ °C}$  gelagert werden.

### **3.5.3 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Zur Herstellung von Gefrierschnitten am Kryostaten (Material 2.3.) wurden die eingefrorenen Proben so in Tissue-Tek<sup>®</sup> Kryogefäße gestellt und in Tissue-Tek<sup>®</sup> Kryomedium eingebettet, dass das Lumen der Gefäßwand bzw. die ventrikuläre und aortale Seite des Segels senkrecht zur Schnittrichtung standen. Ein Antauen der Proben wurde vermieden, indem man die Probenbehälter in Stickstoffdampf hielt. In diesem gefror das Kryomedium mit der eingelegten Probe langsam und somit zellschonend. Nach vollständiger Aushärtung und Entfernung des Kryogefäßes, wurden die Proben bei  $-80\text{ °C}$  gelagert oder gleich in 5 – 8  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte zerteilt, die auf OT aufgefangen wurden. Die untersuchten Schnitte stammten vorwiegend aus dem mittleren Teil der jeweiligen Probe.

### **3.6. Immunhistochemischer Nachweis**

Bei den Versuchen mit ganzen Klappen (Beschichtungsversuche 4.2.2., 4.3.2. und 4.3.3.) und mit Bioprothesen-Patches (Beschichtungsversuche 4.3.1.) wurde nach der Beschichtung mit humanen Zellen deren Besiedelung des porcinen Gewebes mittels immunhistochemischer Untersuchungen überprüft, um humane Zellen von eventuell noch anhaftenden, regenerierten porcinen Zellen zu unterscheiden und die Vitalität der aufgetragenen Zellen nachzuweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere monoklonale Antikörper (Material 2.2.) verwendet: Neben dem allgemein als verlässlichsten Marker für Endothelzellen angesehenen Faktor VIII Antigen-Nachweis (Zetter, 1981) wurde zusätzlich ein Antikörper gegen PECAM-1 (*platelet endothelial adhesion molecule-1*), auch als CD31 bekannt, verwendet, da mit ihm Endothelzellen äußerst effektiv nachgewiesen werden können (Bengtsson et al., 1995). Im Gegensatz zum Faktor VIII Antigen nahm die CD31 Konzentration auch bei langer Kulturdauer nicht ab (Johnson et al., 1992). Ein weiterer Nachweis für die Aktivität von Endothelzellen war die Bildung von Komponenten der Basallamina wie Kollagen IV und Laminin (Fajardo, 1988), gegen die ebenfalls Antikörper eingesetzt wurden (Material 2.2.). Die verwendeten Fibroblasten wurden mit zwei Antikörpern nachgewiesen. Zu Beginn der Arbeit stand für diesen Nachweis ein Antikörper gegen die humane Prolyl-4-Hydroxylase zur Verfügung (Maus-Anti-Human Fibroblasten Antikörper Klon 5B, DAKO, Hamburg), die jedoch auch auf humanen Endothelzellen exprimiert wurde. Deshalb kam dieser Antikörper nur zur Färbung der Fibroblasten vor dem Auftrag der autologen Endothelzellen zum Einsatz. Später stand ein neuer, sehr spezifischer Antikörper (Maus-Anti-Human Fibroblasten Antikörper Klon ASO2; Dianova, Hamburg) zur Detektion von humanen Fibroblasten zur Verfügung, der an das von humanen Fibroblasten exprimierte Oberflächenantigen Thy-1 (Thymidylate synthase complementing protein = CD90) band. Mit diesem konnten Fibroblasten auch nach mehrwöchiger Inkubation mit Endothelzellen nachgewiesen werden.

Die verwendeten Antikörper wurden indirekt detektiert, d.h. nicht der Primär-, sondern erst der Sekundärantikörper war enzym- oder fluoreszenzkonjugiert. Bei der Fluoreszenzmarkierung wurden Fluoreszein (FITC) markierte Sekundärantikörper verwendet (Methoden 3.6.1.), deren Reaktion bei einer Wellenlänge von 560 nm im PKM untersucht wurde. Allerdings trat bei einigen der untersuchten Proben eine störende Hintergrundfluoreszenz auf. Deshalb wurde der Großteil der Proben mit peroxidasekonjugierten Sekundärantikörpern detektiert (Methoden 3.6.2.). Als Detektionssystem diente das LSAB<sup>®</sup>2 System (LSAB = labelled StreptAvidin-Biotin).

### **3.6.1. FITC-markierte Sekundärantikörper**

Die OT mit Gefrierschnitten wurden vor der Färbung 24 h bei RT getrocknet. Die OT mit angesäten Zellen wurden hingegen nach der Entnahme aus dem Kulturmedium kurz in PBS gespült, um das FCS-haltige Medium zu entfernen, da dies die Färbung gestört hätte. Anschließend wurden die OT 10 Min in  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton fixiert. Nach der Entnahme und nachdem das Aceton getrocknet war, wurden die OT 5 Min in PBS gespült. Inzwischen wurde der jeweilige Primärantikörper (Material 2.2.) nach Herstellerangaben in Antikörper Diluent (Material 2.2.) verdünnt, auf die OT pipettiert ( $50\text{ }\mu\text{l/Schnitt}$ ) und diese für 1 h in einer feuchten Kammer bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die OT zwei mal 5 Min in PBS gespült, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Der zugehörige FITC-markierte Sekundärantikörper (Material 2.2.) wurde ebenfalls nach Herstellerangaben verdünnt und auf die Schnitte pipettiert ( $50\text{ }\mu\text{l/Schnitt}$ ) und inkubiert (siehe oben). Danach wurde ungebundener Antikörper durch zweimalige Spülung in PBS und einmaliger Spülung in Aqua bidest entfernt, die OT mit Abdeckmedium (fluorescent mounting medium) fixiert und ein Deckglas ( $24\text{ x }24\text{ mm}$ ) luftblasenfrei aufgelegt.

### **3.6.2. LSAB<sup>®</sup> 2 System**

Dieses Detektionssystem basiert darauf, dass ein biotinylierter Sekundärantikörper einen Komplex mit Peroxidase-konjugierten Streptavidinmolekülen bildet. Vorteil der Peroxidasefärbung war, dass bei ihr das Problem einer störenden Hintergrundfluoreszenz (Eigenfluoreszenz, Artefaktfärbung) nicht auftrat. Die Vorbereitung der OT erfolgte wie unter Punkt 3.6.1. beschrieben. Nach der Fixierung in Aceton und der darauf erfolgten Spülung wurden die OT 10 Min in eine  $0,01\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (Material 2.6.) gelegt, um endogene Peroxidase im Gewebe zu maskieren. Nach der Spülung in PBS erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (Material 2.2.) bei RT in einer feuchten Kammer. Nach der Inkubation wurden die OT 5 Min in Tris-Tween20-Puffer gelegt (Material 2.6.). Dieser Vorgang wurde nach der 10-minütigen Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper wiederholt. Anschließend wurde das Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Streptavidin zugegeben und 10 Min inkubiert. Nach erneutem Bad im Tris-Tween20-Puffer, wurden die OT 10 Min mit dem Farbstoff Aminoethylcarbazol (AEC) inkubiert, worauf eine Spülung in Leitungswasser folgte. Um die Zellkerne gegenüber der roten Peroxidasefärbung hervorzuheben wurde eine Gegenfärbung mit  $20\%$  Hämalaunlösung (Material 2.6.) durchgeführt (Inkubation für 1 bis 2 Min). Bei Hämalaun handelt es sich um einen basischen Farbstoff, der die basophilen Zellkerne blau färbt.

### **3.6.3. Negativkontrolle**

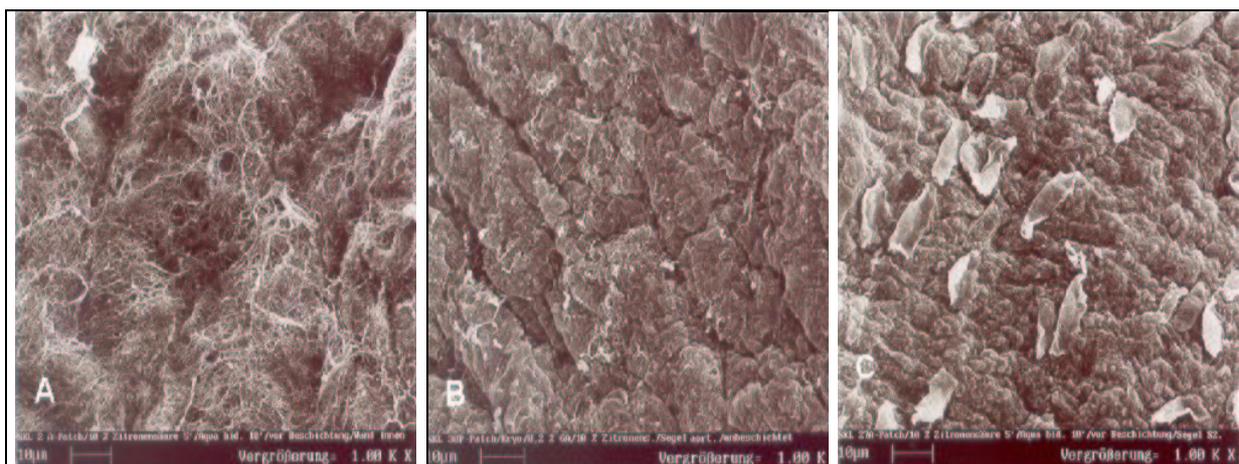
Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung der verwendeten humanen Antikörper an porcine Zellen, wurden unbeschichtete und beschichtete Proben mit Peroxidase- oder FITC-konjugierten Schweine-Immunglobulin (IgG) gefärbt, wobei das IgG statt der humanen Antikörper (Material 2.2.) als Primärantikörper eingesetzt wurde. Nur wenn sowohl die unbesiedelte als auch die besiedelte Probe keine Färbung der Zellen bzw. der Matrix zeigte, wurde eine Farbreaktion der Zellen auf einem besiedelten Patch, die mit den humanen Primärantikörpern durchgeführt worden war, positiv gewertet.

## **3.7. Beurteilung nativer Kontrollen**

### **3.7.1. Schweineherzklappen**

#### **3.7.1.1. Am Rasterelektronenmikroskop**

Um die Besiedelung des porcinen Gewebes beurteilen zu können, wurden unbesiedelte, native Gefäßwand- und Segelproben von SKL als Kontrollen benutzt. Das Gefäßlumen (Abb. 3A) dieser Proben war fast immer zellfrei. Bei Proben mit residualen porcinen Zellen war weniger als 20% der Oberfläche bedeckt. Ebenso verhielt es sich mit der aortalen Seite des Segels (Abb. 3B). Die Ventrikularis zeigte meist eine partielle Anhaftung nativer porciner Zellen (Abb. 3C), die weniger als 40% der Fläche besiedelten.



**Abb. 3: REM Aufnahmen von unbeschichteten SKL-Proben:** Die luminale Gefäßwand (A) und die aortale Seite des Segels (B) waren zellfrei und zeigten ein Geflecht aus Kollagenfasern. Auf der Ventrikularis waren einzelne porcine Zellen zu erkennen (C). Vergrößerung 1000x

Fibroblasten auf beschichteten Proben (Abb. 4A) zeigten im REM eine spindelförmige Morphologie (Jaffe et al., 1973; Lanquiera et al., 1995) und die Endothelzellen waren durch das für sie typische Pflastersteinmuster (Abb. 4B) zu charakterisieren (Jaffe et al., 1973). Oft war die Beurteilung des Besiedlungserfolges mit den jeweils auf das porcine Material aufgetragenen Zellen bereits durch den Vergleich der beschichteten Probe mit der unbeschichteten Kontrolle am REM möglich. Alle rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen dieser Arbeit stellen, soweit nicht anders angegeben, eine 200 x Vergrößerung der untersuchten Probe dar.

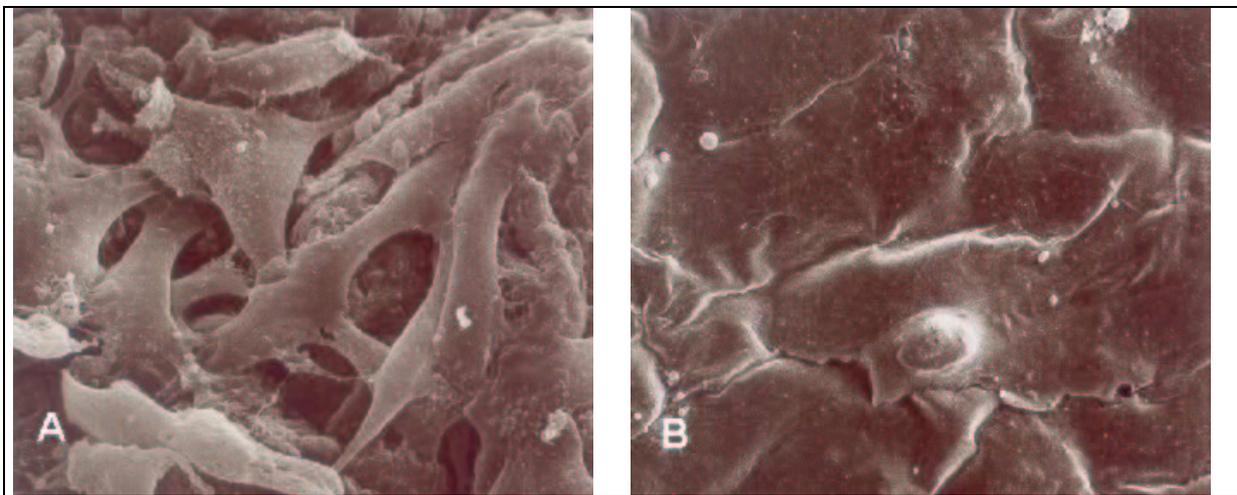


Abb. 4 REM Aufnahmen von besiedelten SKL-Proben: Fibroblasten (A) waren durch ihre spindelförmige Morphologie gut zu identifizieren. Endothelzellen (B) zeigten die für sie typische Pflastersteinstruktur. Vergrößerung 1000 x

### **3.7.1.2. Am Phasenkontrastmikroskop**

Als Kontrolle für Untersuchungen am PKM wurden ebenfalls unbeschichtete Gefäßwand- und Segelproben untersucht. Diese wurden mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und zeigten keine Reaktion (Abb. 5A und B). Somit war auch nachgewiesen, dass gegebenenfalls noch anhaftende porcine Zellen keine Kreuzreaktion mit den humanen Antikörpern aufwiesen und es sich bei detektierten Zellen tatsächlich um humane Zellen handelte. Die Untersuchung ungefärbter Proben zeigte, dass das porcine Gewebe bei einer Wellenlänge von 560 nm keine nennenswerte Hintergrundfluoreszenz aufwies. Die immunhistochemischen Untersuchungen der verwendeten humanen Zellen auf ihre Expression von Faktor VIII, CD31, Kollagen IV, Laminin, CD90 bzw. Prolyl-4-Hydroxylase (Methoden 3.6.) wurden als positiv gewertet, wenn

die Zellen auf dem untersuchten Gewebe eine rote Peroxidase- bzw. eine fluoreszierende grüne Färbung zeigten (Abb. 5C und D). Die immunhistochemischen Nachweise wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

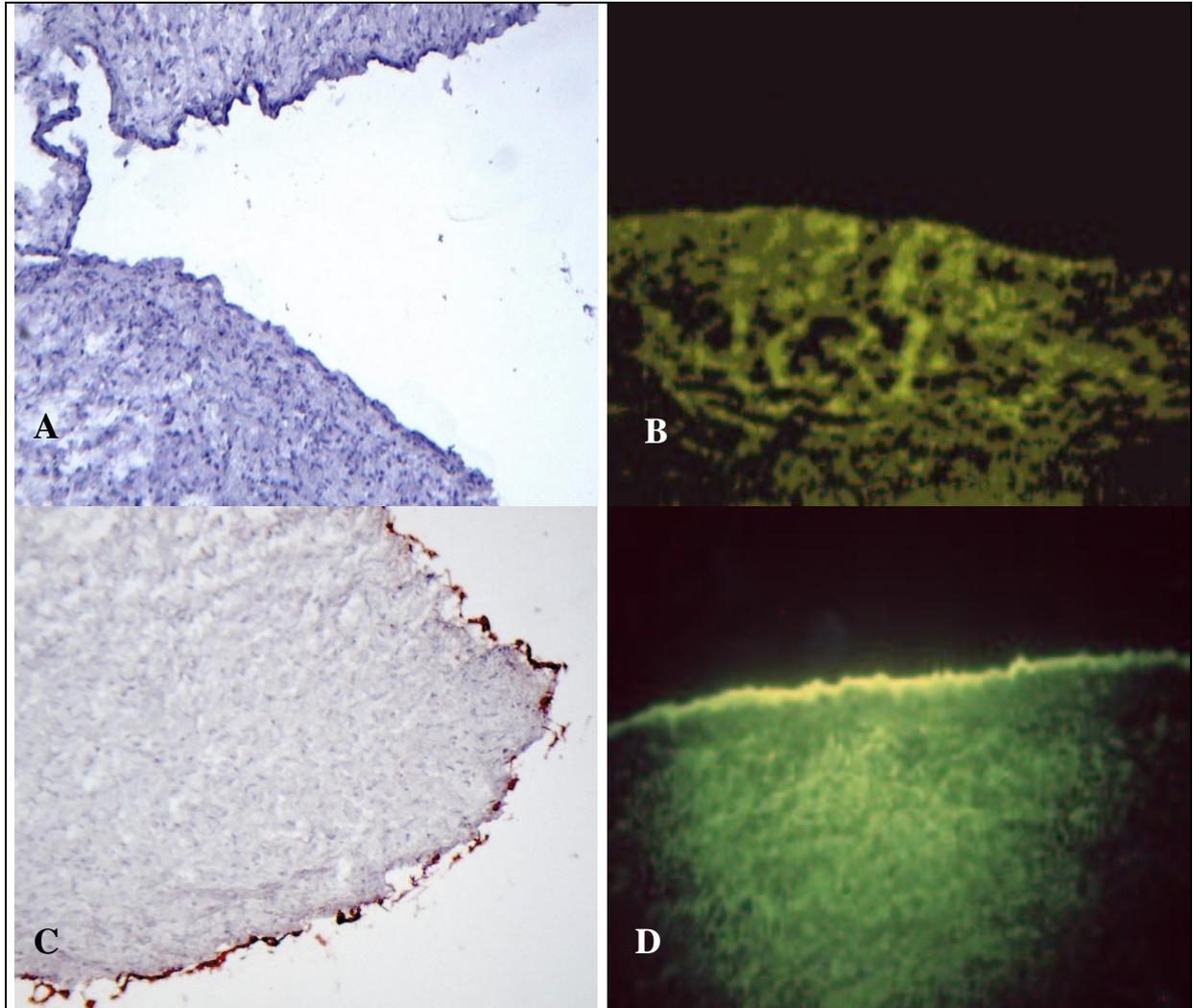
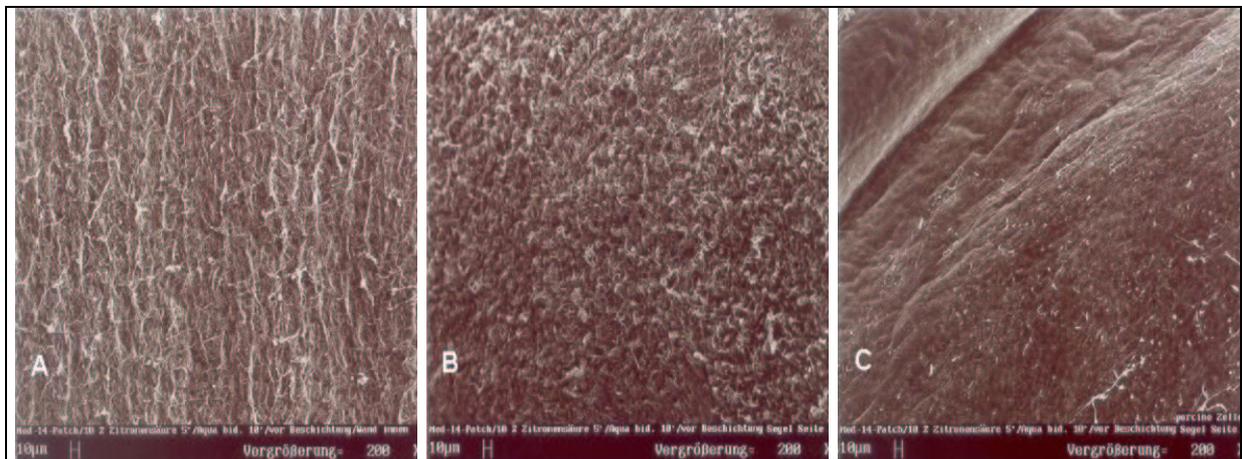


Abb. 5 Beispiele für immunhistochemische Vergleichsproben: Eine unbeschichteten Wandprobe (A) zeigte im Gegensatz zu einer mit humanen Zellen besiedelten Probe (C) keine Rotfärbung der Zellen. Ebenso verhielt sich eine unbesiedelte Probe, die mit einem FITC-gekoppelten Anti-Faktor VIII-AK (B) inkubiert wurde. Befanden sich Faktor VIII exprimierende Zellen auf der Probe (D), leuchten diese bei einer Wellenlänge von 560 nm hellgrün.

## **3.7.2. Medtronic Bioprothesen**

### **3.7.2.1. Am Rasterelektronenmikroskop**

Ebenso wie bei den SKL-Versuchen (Ergebnisse 5.2.) wurden native, unbeschichtete porcine Gefäßwand- und Segelproben zum Vergleich der REM Daten verwendet. Die professionelle Aufbereitung der Prothesen bewirkte, dass die Gefäßwand der Freestyle® Prothesen ein zellfreies Kollagengerüst zeigte (Abb. 6A). Ebenso stellte sich die Oberfläche der aortalen Segelseite dar (Abb. 6B), während auf der ventrikulären Seite bei manchen der untersuchten Proben noch adhärenzte porcine Zellen zu sehen waren (Abb. 6C).



**Abb. 6** REM Aufnahmen unbeschichteter Medtronic Bioprothesen: Die luminal Gefäßwand (A) und die aortale Seite des Segels (B) waren i.d.R. zellfrei. Nur die ventrikuläre Seite des Segels (C) zeigte manchmal noch einige anhaftende porcine Zellen.

### **3.7.2.2. Am Phasenkontrastmikroskop**

Immunhistochemische Untersuchungen (Methoden 3.6.) der unbeschichteten Bioprothesen zeigten keine Reaktion mit den verwendeten Peroxidase-gekoppelten Antikörpern gegen CD90, Prolyl-4-Hydroxylase, CD31, Faktor VIII (Abb. 7A), Laminin und Kollagen IV (Abb. 7B). Ebenso wenig reagierten die FITC-gekoppelten Antikörper in der Immunfluoreszenzüberprüfung (Abb. 7C). Alle gezeigten Abbildungen stellen, soweit nicht anders angegeben, eine 100-fache Vergrößerung dar.

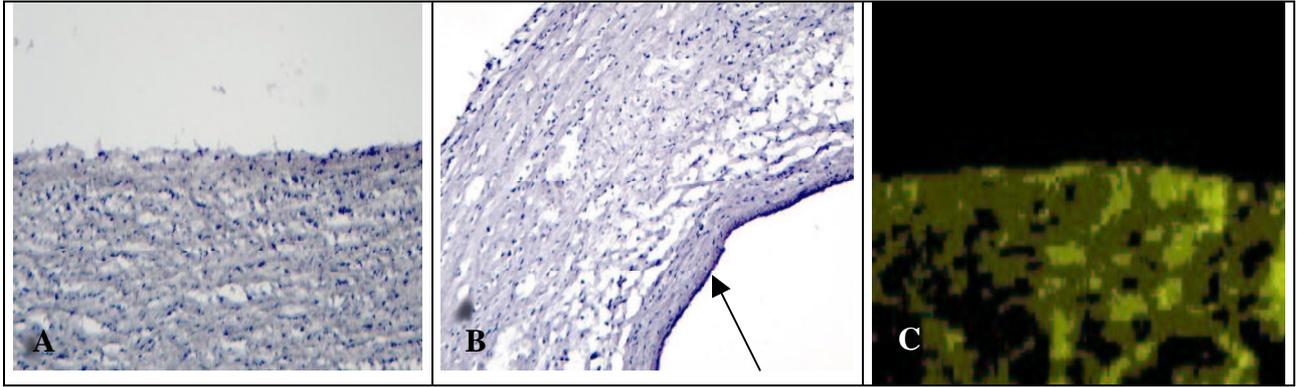


Abb. 7 Immunhistochemische Färbung unbeschichteter Medtronic Bioprothesen: Gefäßwand mit Peroxidase-gekoppeltem (A) bzw. FITC-gekoppeltem (C) Faktor VIII-AK und Segel mit Peroxidase-gekoppeltem CD31-AK (B) zeigten vor der Beschichtung mit humanen Zellen keine positive immunhistochemische Reaktion. Eine Segelseite zeigte porcine Zellen, deren Zellkerne durch Hämalaun angefärbt waren (Pfeil).

# ENDOTHELIALISIERUNGSVERSUCHE

## **4. Endothelialisierungsversuche**

### **4.1. Allgemeines**

#### **4.1.1. Zellbeschichtung in Gewebekulturplatten**

Sollten Patches mit Zellen besiedelt werden, wurden die Gefäßwände von SKL bzw. Medtronic Bioprothesen nach ihrer Vorbehandlung (Methoden 3.3.1.) in ca. 2 bis 4 cm<sup>2</sup> große Stücke zerteilt, die einzeln in jeweils eine der sechs Vertiefungen einer Gewebekulturplatte (Abb. 8) gelegt wurden. Die zur Beschichtung bestimmten Fibroblasten bzw. Endothelzellen wurden trypsiniert (Methoden 3.1.3.), das zentrifugierte Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und die Lebendzellzahl mit Trypanblau (Methoden 3.1.4.) bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension, die auf ein Volumen von 1 ml eingestellt wurde, auf das jeweilige Patch aufgetragen. Die Lebendzellzahl der aufgebrachten Zellen pro Patch betrug  $1 \pm 0,25 \times 10^6/\text{cm}^2$  bei  $n = 96$ . Für die primäre Zelladhäsion wurden die Platten 45 Min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde jede Plattenvertiefung mit 4 ml Kulturmedium befüllt und weiter inkubiert. Die Zugabe erfolgte durch vorsichtiges Ansetzen der Pipette am Rand der Vertiefung, um die Zellen nicht vom Patch zu spülen. Nach 24 h und weiter alle 2 bis 3 Tage wurde das Medium erneuert.



Abb. 8 SKL-Patches aus der Aortenwand: Je ein Patch wurde pro Vertiefung eingebracht. Die luminale Seite der Gefäßwand zeigte nach oben.

#### **4.1.2. Zellbeschichtung in der Beschichtungsapparatur**

Alle vollständigen Herzklappen, die im Laufe dieser Arbeit mit Zellen beschichtet wurden, wurden in einer speziellen Beschichtungsapparatur (Abb. 9A) mit den Zellen inkubiert. Diese war von Frau A. Uhlig und Herrn Humbs für die Herzchirurgische Abteilung des Klinikums Großhadern entwickelt worden. Jede Klappe wurde zunächst in einen speziell angefertigten, offenen Teflonzylinder eingenäht (Abb. 9B und C), der anschließend in den Beschichtungsbehälter gestellt wurde. Dieser wurde mit 50 ml Kulturmedium gefüllt und die Zellsuspension (20 ml) zugegeben. Durchschnittlich wurden die Klappen dabei mit  $2,7 \pm 1,5 \times 10^7$  Fibroblasten (n = 21) und/oder  $4,8 \pm 3,4 \times 10^7$  Endothelzellen (n = 29) beschichtet. Der Behälter wurde anschließend vollständig mit Kulturmedium gefüllt (ca. 25 ml je nach Klappengröße) und verschlossen. Der Deckel besaß eine Öffnung, in den ein Verbundhahn eingeschraubt wurde. Über diese Verbindung wurde die im Behälter noch vorhandene Luft gegen Medium ausgetauscht. Der Behälter wurde in das Rotationsgerät eingespannt und für 24 h im Brutschrank inkubiert, wobei sich der Zylinder in der vertikalen Ebene und gleichzeitig axial jeweils 150 Sekunden drehte (Abb. 9D) und dann 30 Min in jeweils unterschiedlichen Positionen zur Ruhe kam, damit sichergestellt war, dass alle Bereiche der Klappe in Kontakt mit den inkubierten Zellen kamen. Nach der Inkubation mit der Zellsuspension wurde das Medium zentrifugiert, das Pellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (Methoden 3.1.4.). So wurde die primäre Adhäsion der inkubierten Zellen an das Klappenmaterial festgestellt. Die Herzklappe wurde in ein steriles Glasgefäß mit 120 ml Kulturmedium überführt. Drei Öffnungen im Deckel des Glases wurden mit je einem  $0,22 \mu\text{m}$  Filter (Material 2.4.) versehen, wodurch ein steriler Gasaustausch des Mediums mit der im Brutschrank herrschenden Atmosphäre während der mehrwöchigen Inkubationszeit gewährleistet war. Der Wechsel des Mediums erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Die Herzklappe wurde nach einer Inkubation mit Fibroblasten mit Fibroblastenmedium (Material 2.6.) versetzt, bis Endothelzellen aufgebracht wurden. Ab dann wurde ausschließlich Endothelzellmedium (Material 2.6.) zugegeben.

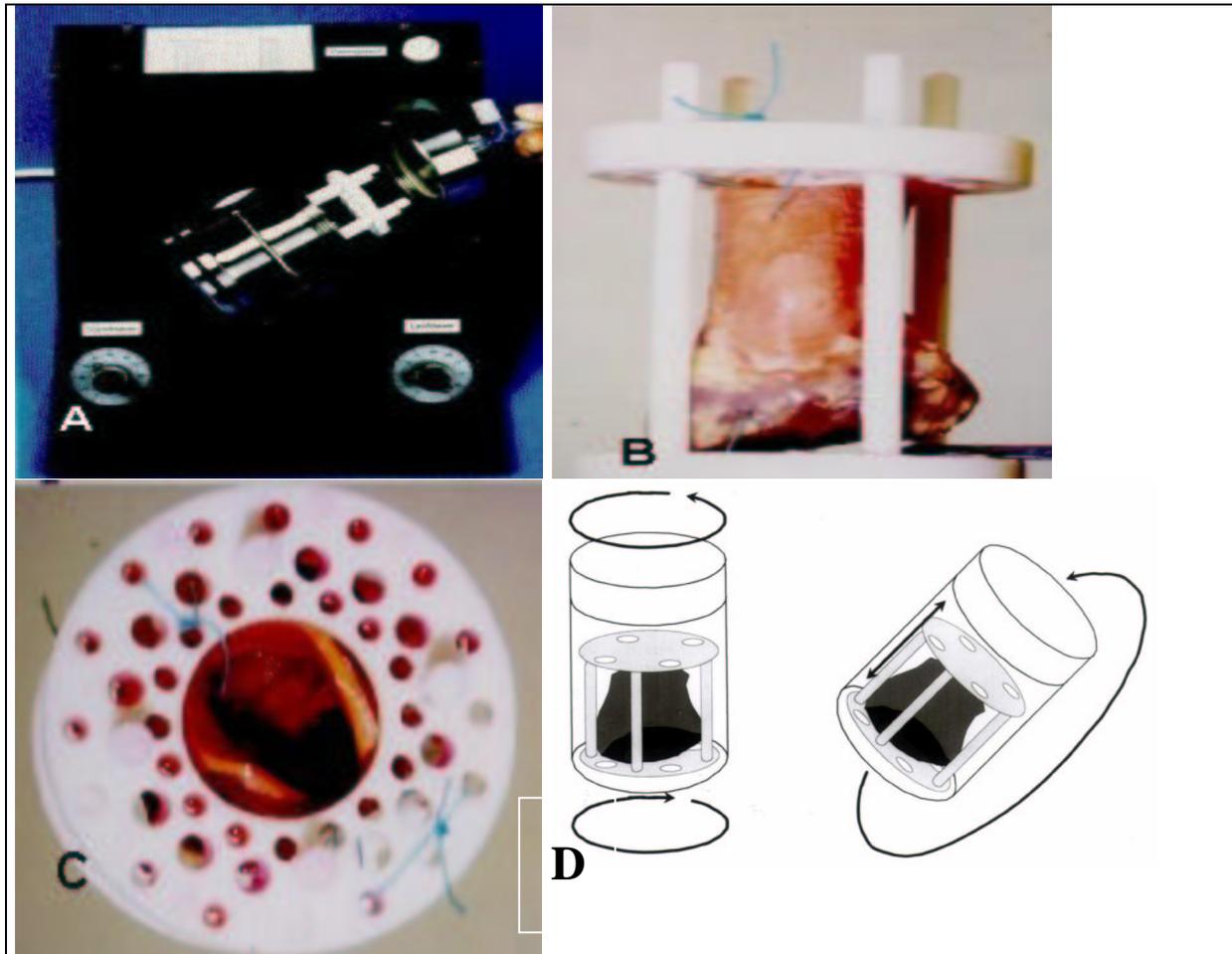


Abb.9 Beschichtungsgerät und Zubehör: Bild A zeigt das Beschichtungsgerät mit eingespanntem Beschichtungsbehälter aus Metall bei geöffnetem Deckel und dem leeren Teflongestell, während bei B (Seitenansicht) und C (Sicht von oben) eine Klappe im Gestell befestigt war. In Bild D wurde schematisch die Rotation des Behälters im Gerät gezeigt.

#### **4.1.3. Probenentnahme und -untersuchung**

Bei allen Versuchen mit ganzen SKL oder Bioprothesen, wurden ca. 2 cm<sup>2</sup> große Proben aus der Gefäßwand bzw. 1 cm<sup>2</sup> große Proben aus den Segeln entnommen. Je eine Hälfte wurde für das REM (Methoden 3.4.) und die andere für die immunhistochemischen Untersuchungen fixiert (Methoden 3.5.2.). Die Entnahme erfolgte nach jeweils 24-stündiger Fibroblasten- bzw. Endothelzellinkubation. Weitere Proben wurden nach 7, 14, und 21 Tagen entnommen. Versuchsbedingt konnten sich diese Entnahmen um einen Tag verschieben. Bei Klappen, die länger als 21 Tage nach der Endothelzellbeschichtung inkubiert wurden, erfolgte die Probenentnahme über diesen Zeitpunkt hinaus individuell und wurde im Versuchsablauf beschrieben.

Bei der Entnahme der Segelproben war es zum Teil schwierig, an die Segel heran zu kommen ohne das Gefäßlumen zu berühren und somit eventuell dort anhaftende Zellen mechanisch zu lösen. Außerdem musste jede Segelprobe von ca. 1 cm<sup>2</sup> Größe in drei Teile geschnitten werden. Zwei Teile wurden für das REM fixiert (Methoden 3.4.1.), um die Ventrikularis und die aortale Segelseite zu untersuchen, der dritte Teil wurde für die immunhistochemischen Färbungen vorbereitet (Methoden 3.5.2. und 3.5.3.). Dadurch waren die zu untersuchenden Proben relativ klein. Bei Probenentnahmen nach 24-stündiger bzw. 7-tägiger Fibroblasten oder Endothelzellinkubation und weiteren Entnahmen nach 7, 14 und 21 Tagen nach Aufbringen der Endothelzellen, wären die Segel bereits nach 14, spätestens aber nach 21 Tagen aufgebraucht und eine weitere Dokumentation nicht möglich gewesen. Deshalb erfolgte die Dokumentation der Segelbeschichtung über einen Zeitraum von über 21 Tagen nach Zellinkubation anhand der Untersuchung von Proben verschiedener Klappen an den Tagen 7, 14, 21 und darüber hinaus.

Von jeder Herzklappe wurde zusätzlich vor der Inkubation mit Zellen jeweils eine Wand- und/oder Segelprobe entnommen. Diese Proben dienten als native, unbeschichtete Negativkontrolle zur Beurteilung des Beschichtungsergebnisses (Methoden 3.7.).

Der immunhistochemische Nachweis für humane Endothelzellen und Fibroblasten (Methoden 3.6.) wurde bei allen entnommenen Proben durchgeführt.

Bei den Bioprothesen mit Stent bestand das zu untersuchende Gewebe ausschließlich aus Segelmaterial. Der Vorteil dabei war, dass die Segel sowohl für die Beschichtung als auch für die Probenentnahme gut zugänglich waren. Der Nachteil war, dass die entnommenen Proben von beiden Seiten untersucht werden mussten, um die Beschichtungsergebnisse sowohl der ventrikulären als auch der aortalen Seite erfassen zu können. Hierzu mussten die Proben zerteilt werden (siehe oben), was zu einer effektiven Verringerung der zu untersuchenden Fläche führte und die ohnehin geringe Probenmenge noch verkleinerte.

## **4.2. Endothelialisierung von Schweineherzklappen**

### **4.2.1. Untersuchung von SKL-Patches**

#### **4.2.1.1. Inkubation unterschiedlich vorbehandelter SKL-Patches mit konfluenten Endothelzellen (Toxizitätstest A)**

Um die Toxizität des GA-fixierten Materials zu überprüfen und eine Beeinflussung durch bestimmte Vorbehandlungen zu untersuchen, wurden je 3 Patches von ca. 4 cm<sup>2</sup> Größe der Gruppen A bis I (Methoden 3.3.2.) in die Mitte von Petrischalen gelegt und im Brutschrank inkubiert. Die Schalen waren jeweils mit  $1 \pm 0,3 \times 10^6$  humanen Endothelzellen konfluent

bewachsen. Das Kulturmedium wurde nach 48 h gewechselt. Die Kontrolle der Zellzahl erfolgte durch Trypsinieren (Methoden 3.1.3.) und Zählen (Methoden 3.1.4.) einer separaten Petrischale. Der Zustand der Zellen wurde nach 24, 72 und 96 h im PKM morphologisch beurteilt (Ergebnisse 5.2.1.1.). Ein zellfreier Bereich von mindestens 1,5 cm ( $\pm$  0,8 cm), der den Patch von dem restlichen konfluenten Zellteppich trennte, wurde als negativ "(-)" bezüglich des Überlebens (survival) der Zellen bezeichnet. Waren überhaupt keine Zellen mehr adhären, war das Ergebnis stark negativ "(--)". War eine Kultur noch bis zum Rand des Patches konfluent, zeigte jedoch im Umkreis von ca. 2 cm um den Patch herum eine deutliche Auflockerung des ansonsten dichten Zell-Zell-Kontakts, wurde das Ergebnis als positiv "(+)" beurteilt. Ein stark positives Ergebnis "(++)" hingegen bedeutete 100% Überleben der Zellen ohne Beeinträchtigung der Endothelzellmorphologie. Als Kontrolle diente die morphologische Beurteilung einer Endothelzellschale ohne Patch.

#### **4.2.1.2. Endothelialisierung unterschiedlich vorbehandelter SKL-Patches**

##### **(Toxizitätstest B)**

In diesem Versuch sollte die Adhärenz von Endothelzellen auf GA-fixiertem Klappenmaterial abhängig von einer vorangegangenen Spülung und/oder Säurebehandlung überprüft werden. Hierzu wurden jeweils 4 Wandstücke von ca. 4 cm<sup>2</sup> Größe aus den Gruppen A bis I (Methoden 3.3.2.) in Gewebekulturplatten gelegt und mit je  $1 \pm 0,2 \times 10^6$  Endothelzellen/cm<sup>2</sup> (n = 36) beschichtet. Nach 24 h wurde eine Hälfte jedes Patches fixiert (Methoden 3.4.1.) und die Adhärenz der Zellen im REM überprüft (Methoden 3.4.5.). Der Rest der Patches wurde 7 Tage nach dem Zellauftrag ebenfalls untersucht (Ergebnisse 5.2.1.2.). Die Besiedlungsergebnisse endothelialisierter Patches wurden wie folgt beurteilt:

Patches ohne Zellanhaftung wurden als stark negativ "(--)" eingestuft. War eine Fläche von weniger als 40% mit Zellen besiedelt und/oder waren die Zellen nicht ausgespreizt sondern abgekugelt, wurde das Ergebnis negativ "(-)" bewertet. Zeigte sich hingegen eine besiedelte Fläche von mindestens 40% wurden die Daten positiv "(+)" eingestuft. Waren die Zellen ausgespreizt, zeigten das für Endothelzellen typische Plastersteinmuster und bedeckten mindestens 80% der Probe, womit die Besiedlung als konfluent galt, erfolgte die Einstufung als stark positiv "(++)".

#### **4.2.1.3. Endothelialisierung säurebehandelter SKL-Patches ohne und mit Fibroblasten-vorbeschichtung**

Um zu überprüfen, ob eine Vorbeschichtung mit autologen Fibroblasten eine mindestens 14-tägige konfluente Endothelialisierung ermöglichte, wurden jeweils 4 Patches von ca. 4 cm<sup>2</sup> 7 Tage vor der Endothelialisierung mit autologen Fibroblasten ( $1 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$ ) vorbeschichtet (Gruppe O, Methoden 3.3.2.) und 4 Patches wurden nur mit Endothelzellen ( $1 \pm 0,3 \times 10^6/\text{cm}^2$ ) inkubiert (Gruppe H). Als Negativkontrolle diente ein unbesiedelter Patch (Methoden 3.7.1.1.). Die Probenentnahme für das REM erfolgte 24 h, 7, 14, und 21 Tage nach der Endothelzellinkubation (Ergebnisse 5.2.1.3.). Die Beurteilung erfolgte wie unter 4.2.1.2. beschrieben.

#### **4.2.1.4. Vergleich der Endothelialisierung zitronen- bzw. ascorbinsäurebehandelter Patches**

Um zu untersuchen, ob die Art der verwendeten Säure einen Vor- oder Nachteil bei der Endothelialisierung von mit Fibroblasten vorbeschichteten porcinen Materials hatte, wurden Patches der Gruppe N und O (Methoden 3.3.2.) verwendet. Jeweils 4 Patches (4 cm<sup>2</sup>) aus beiden Gruppen wurden mit  $1 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$  Fibroblasten und 7 Tage darauf mit  $1 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$  Endothelzellen beschichtet. Die Probenbeurteilung erfolgte 24 h nach Fibroblasten- und 7 Tage nach Endothelzellbeschichtung. Die Beurteilung erfolgte wie unter 4.2.1.2. beschrieben.

#### **4.2.1.5. Endothelialisierung säurebehandelter SKL Patches mit PKH26-gefärbten Zellen**

Zum Nachweis dafür, dass die Zellen, die nach einer Beschichtung von GA-fixierten, säurebehandelten Patches im REM zu sehen waren, tatsächlich die humanen Fibroblasten bzw. Endothelzellen aus der verwendeten Kultur waren und nicht regenerierte porcine Zellen, wurden die Zellen vor der Beschichtung mit dem Farbstoff PKH26 intravital gefärbt (Methoden 3.1.5.). Die Beschichtung der SKL Patches erfolgte nach 48-stündiger Kultivierung der gefärbten Zellen, um eine unspezifische Färbung des porcinen Materials durch ungebundenen Farbstoff zu verhindern. Der Erfolg der Färbung wurde direkt vor dem Ablösen der Fibroblasten bzw. Endothelzellen im PKM bei einer Wellenlänge von 560 nm überprüft. Die zur Besiedelung verwendeten Patches (n = 8), je zur Hälfte Wandstücke (2 cm<sup>2</sup>) und Segel (ca. 1 cm<sup>2</sup>), wurden entweder mit  $1 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$  Endothelzellen (Gruppe J, Methoden 3.3.2.) bzw.  $1 \pm 0,3 \times 10^6/\text{cm}^2$  Fibroblasten (Gruppe K) inkubiert. Von den Patches wurde jeweils eine

Hälfte nach 7 Tagen für das REM fixiert (Methoden 3.4.1.). Der Rest des jeweiligen Patches wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und Gefrierschnitte angefertigt (Methoden 3.5.3.). Diese wurden am PKM ausgewertet (Ergebnisse 5.2.1.5.). Als Kontrolle dienten unbeschichtete Patches (Methoden 3.7.1.1.).

#### **4.2.2. Endothelialisierung kompletter glutaraldehydfixierter Schweineherzklappen**

Neben Patches wurden auch ganze Herzklappen (Material 2.7.2.) besiedelt. Die Gründe hierfür waren erstens, dass die Zellen bei der Patchbesiedelung nur auf die Oberfläche der Patches pipettiert (Beschichtungsversuche 4.1.1.) und anschließend inkubiert wurden. Ein Teil der Zellen könnte durch die Erschütterung der Platten beim Transport in den Brutschrank von den Patches gespült worden sein und so nicht für die primäre Adhäsion zur Verfügung gestanden haben, was praktisch einer Verringerung der tatsächlich aufgebrachten Zellen entsprochen hätte und so zu falsch negativen Ergebnissen geführt haben könnte. Zweitens könnte die Versorgung der Zellen in einer mit nur 5 ml Kulturmedium gefüllten Plattenvertiefung, deren Boden i.d.R. konfluent mit Zellen bedeckt war, nicht optimal gewesen sein und somit zu einem vorzeitigen Ablösen der Zellen geführt haben. Drittens war für eine spätere klinische Anwendung v.a. die Endothelialisierung von ganzen klappentragenden Miniroots relevant.

Die Beschichtungsdaten (Ergebnisse 5.2.2.1. bis 5.2.2.3.) der entnommenen Proben (Endothelialisierungsversuche 4.1.3.) wurden wie folgt beurteilt: Als konfluent bzw. stark positiv "(++)" wurde eine Zellbesiedelung mit ausgespreizten Zellen angesehen, die mindestens 80% der Probe bedeckten. Eine partielle Besiedelung ausgespreizter Zellen von mindestens 40% der Fläche wurde als positiv "(+)" gewertet. Eine Besiedelung, die darunter lag und/oder aus morphologisch auffälligen (= abgekugelten) Zellen bestand, wurde negativ "(-)" eingestuft. Waren keine Zellen zu sehen, galt das Ergebnis als stark negativ ("- -").

##### **4.2.2.1. Endothelialisierung von SKL nach unterschiedlicher Spülung**

Auf Grund der Daten der Patchversuche zur Endothelialisierung von gespültem porcinen Klappengewebe (Ergebnisse 5.2.1.2.) wurden aus den Gruppen B, F, L und M (Methoden 3.3.2.) insgesamt 8 SKL (SKL 1 bis 8) untersucht, um den Einfluss einer 10-minütigen bzw. 24-stündigen Spülung von ganzen Herzklappen mit 0,9% NaCl bzw. M199 auf das Endothelialisierungsergebnis zu vergleichen. Außerdem wurden vier Klappen mit autologen Fibroblasten vorbeschichtet. Je 2 Herzklappen aus jeder Gruppe wurden nach der Spülung

(Methoden 3.3.1.) mit  $1,3 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$  Endothelzellen (Gruppe B und F) bzw. mit  $1,0 \pm 0,4 \times 10^6/\text{cm}^2$  Fibroblasten (Gruppe L und M) besiedelt (Endothelialisierungsversuche 4.1.2.). Nach 7 Tagen wurden auf die Klappen der Gruppen F und M zusätzlich  $2,2 \pm 0,4 \times 10^6/\text{cm}^2$  Endothelzellen aufgebracht.

#### **4.2.2.2. Endothelialisierung säurebehandelter SKL mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung**

Die SKL 9 bis 11 wurden der Gruppe H entnommen, die SKL 12 bis 14 und 16 der Gruppe O und SKL 15 der Gruppe P (Methoden 3.3.2.) und der Beschichtungserfolg miteinander verglichen.

#### **4.2.2.3. Endothelialisierung einer kryo- und einer nicht-kryopräservierten SKL**

Die Daten der Endothelialisierung von SKL 15 (Gruppe P), die zusammen mit den Klappen der Gruppe O erfasst worden waren (Ergebnisse 5.2.2.2.), gaben einen Hinweis darauf, dass eine nicht erfolgte Kryopräservierung negative Auswirkungen auf den Beschichtungserfolg einer SKL haben könnte. Deshalb wurde die Gruppe P eingeführt und eine SKL aus dieser mit einer SKL der Gruppe O verglichen (Ergebnisse 5.2.2.3.).

#### **4.3. Endothelialisierung kommerzieller glutaraldehydfixierter Bioprothesen**

Wie bereits bei den Beschichtungen von SKL, wurden für die folgenden Versuche mit Bioprothesenmaterial sowohl Patches als auch komplette klappentragende Miniroot-Prothesen (Material 2.7.2.) besiedelt. Außerdem wurden Bioprothesen mit Stent (Material 2.7.3.) untersucht, um zu sehen, ob das Gerüstmaterial für eine Zellbesiedelung hinderlich wäre.

Die Bioprothesen waren nicht wie die SKL in fast unbegrenzter Menge vorhanden. Insgesamt wurden von der Firma Medtronic 8 Freestyle<sup>®</sup> und 5 Mosaic<sup>®</sup> Bioprothesen zur Verfügung gestellt. Deshalb wurden nur die SKL-Versuche, die die interessantesten Beschichtungsdaten geliefert hatten, wiederholt.

Die Beschichtungsdaten (Ergebnisse 5.3.1.1. bis 5.3.3.) der entnommenen Proben (Endothelialisierungsversuche 4.1.3.) wurden wie unter Punkt 4.2.2. beschrieben beurteilt.

### **4.3.1. Untersuchung von Patches aus Freestyle® Bioprothesen**

#### **4.3.1.1. Endothelialisierung säurebehandelter Bioprothesen-Patches mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung**

Diese Beschichtung wurde analog zum Versuch 4.2.1.3. durchgeführt. Hierzu wurden vier ca. 2 cm<sup>2</sup> große Freestyle®-Patches der Gruppe O (Methoden 3.3.2.) mit  $1 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$  Fibroblasten und 7 Tage später mit  $1 \pm 0,3 \times 10^6/\text{cm}^2$  Endothelzellen beschichtet. Vier gleich große Patches der Gruppe H wurden ausschließlich mit  $1 \pm 0,3 \times 10^6/\text{cm}^2$  Endothelzellen inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte bis zum 14. Tag nach der Endothelzellinkubation. Zusätzlich zur REM Beurteilung wurden von den Patches Gefrierschnitte angefertigt (Methoden 3.5.3.) und immunhistochemisch untersucht (Methoden 3.6.).

#### **4.3.1.2. Vergleich der Endothelialisierung zitronen- bzw. ascorbinsäurebehandelter Bioprothesen-Patches**

Um zu untersuchen, ob die Art der verwendeten Säure einen Einfluss auf die Endothelialisierung von mit Fibroblasten vorbeschichteten Bioprothesenmaterial hatte, wurden analog zu Versuch 4.2.1.4. Feestyle®-Patches der Gruppe N und O (Methoden 3.3.2.) verwendet. Jeweils 4 Patches (4 cm<sup>2</sup>) aus beiden Gruppen wurden mit  $0,4 \pm 0 \times 10^6/\text{cm}^2$  Fibroblasten beschichtet. Nach 7 Tagen wurden  $1 \pm 0,2 \times 10^6/\text{cm}^2$  Endothelzellen aufgebracht. Nach weiteren 7 Tagen wurde das Beschichtungsergebnis im REM überprüft.

### **4.3.2. Endothelialisierung von Mosaic® Bioprothesen**

#### **4.3.2.1. Endothelialisierung von Mosaic® Bioprothesen mit bzw. ohne Fibroblastenvorbeschichtung**

Auf Grund der Daten des Versuchs 4.2.2.1. wurden analog dazu zwei Mosaic® Bioprothesen (Med-5 und -6) aus den Gruppen F und M (Methoden 3.3.2.) miteinander verglichen. Die Gruppen B und L, die im SKL-Versuch ebenfalls überprüft worden waren, wurden mit Bioprothesenmaterial nicht mehr untersucht, nachdem sich herauskristallisiert hatte, dass nur eine 24-stündige Spülung in M199 eine Endothelzellanhaftung ermöglichte. Die Mosaic® Bioprothesen wurden gespült (Methoden 3.3.1.) und Med-5 mit  $1,4 \times 10^6/\text{cm}^2$  Fibroblasten beschichtet. Nach 7 Tagen wurden zusätzlich  $6,3 \times 10^6/\text{cm}^2$  Endothelzellen aufgebracht. Med-6 wurde mit  $3,3 \times 10^6/\text{cm}^2$  Endothelzellen inkubiert.

#### **4.3.2.2. Endothelialisierung säurebehandelter Mosaic<sup>®</sup> Bioprothesen nach Fibroblastenvorbeschichtung**

Analog zu den in Versuch 4.2.2.2. endothelialisierten SKL der Gruppe O (Methoden 3.3.2.) wurden drei Mosaic<sup>®</sup> Bioprothesen (Med-1, -2 und -6) aus derselben Gruppe untersucht, um den Einfluss einer Zitronensäurebehandlung (Methoden 3.3.1.) auf die Endothelialisierbarkeit gestenteter Prothesen zu überprüfen. Die Klappen wurden mit  $1,0 \pm 0,6 \times 10^6/\text{cm}^2$  Fibroblasten beschichtet. Nach 7 Tagen wurden  $2,7 \pm 2,2 \times 10^6/\text{cm}^2$  Endothelzellen aufgebracht.

#### **4.3.3. Endothelialisierung von Freestyle<sup>®</sup> Bioprothesen**

Mit der Untersuchung dieser Bioprothesen, sollten die bis dato erfassten Daten bezüglich des Einflusses der Säurebehandlung, Spülung und Fibroblastenvorbeschichtung auf die dauerhafte Endothelialisierung von porcinem Material verifiziert werden. Dabei stand v.a. im Vordergrund, ob sich das kommerziell erhältliche Material der Miniroot-Prothesen ebenso verhält wie die in dieser Arbeit untersuchten SKL. Deshalb wurden die noch zur Verfügung stehenden 6 Freestyle<sup>®</sup> Bioprothesen nach dem Schema der Gruppe O (Methoden 3.3.2.) behandelt. Die Miniroots Med-3 und 4 und Med-9 bis 11 hatten eine durchschnittliche Oberfläche von  $35,1 \pm 4,2 \text{ cm}^2$  und wurden mit  $1,0 \pm 0,6 \times 10^6/\text{cm}^2$  Fibroblasten (in einem Bereich von 0,5 bis  $2,2 \times 10^6/\text{cm}^2$ ) und 7 Tage später mit  $1,3 \pm 1,2 \times 10^6/\text{cm}^2$  Endothelzellen (in einem Bereich von 0,3 bis  $3,0 \times 10^6/\text{cm}^2$ ) beschichtet.

# ERGEBNISSE

## **5. Ergebnisse**

### **5.1. Allgemeines**

#### **5.1.1. Korrelation zwischen Vene und resultierender Primärkultur**

Weder Alter, Geschlecht noch Blutgruppe der Spender/innen hatten Einfluss auf die spätere Qualität und Ergiebigkeit der angelegten Zellkulturen. Ebenso verhielt es sich mit der Länge der insgesamt 60 verarbeiteten Venen, die durchschnittlich  $13,3 \pm 5,7$  cm betrug. So proliferierten Kulturen, die aus kurzen Venen (4 cm) gewonnen wurden u. U. besser als solche aus langen Venen (30 cm) oder die Zellen von älteren Patienten waren proliferationsfreudiger als Zellen jüngerer Patienten und umgekehrt. Die verwendeten Fibroblastenkulturen waren nach  $42 \pm 10$  Tagen auf der 6. Passage und hatten eine durchschnittliche Zellzahl von  $2,7 \pm 1,5 \times 10^7$  erreicht. Wurden von derselben Vene sowohl die Endothelzellen als auch die Fibroblasten verwendet, erfolgte die Verwendung der Endothelzellen erst 7 Tage später und deshalb befanden sich die Kulturen bereits auf Passage 7 oder 8 und die mittlere Kulturdauer lag folglich bei  $49 \pm 10$  Tagen. Wurden Herzklappen nur mit Endothelzellen besiedelt, waren die Daten mit denen für Fibroblasten vergleichbar. Die durchschnittliche Zellzahl der Endothelzellkulturen bei ihrer Besiedelung lag bei  $4,8 \pm 3,4 \times 10^7$ .

#### **5.1.2. Probleme bei der Probenaufbereitung von Klappensegeln**

##### **5.1.2.1. Probleme bei der Aufbereitung für das Rasterelektronenmikroskop**

Beim Trocknungsvorgang eines Segels im Kritisch-Punkt-Trockner (Methoden 3.4.3.) zog sich die ohnehin unebene Oberfläche des Segels meist stark zusammen und musste beim Aufkleben auf die Probenhalter wieder gespreizt werden, was zu Rissen im Material und dem aufliegenden Zellrasen führte. Manchmal war durch die starke artifizielle Kontraktion des Gewebes nicht mehr zu erkennen, welches die aortale bzw. die ventrikuläre Seite war. In diesen Fällen wurde die in zwei Hälften geteilte und unterschiedlich aufgeklebte Probe mit Seite 1 bzw. 2 bezeichnet. In jedem Fall wurden beide Seiten untersucht.

##### **5.1.2.2. Probleme bei der Anfertigung von Gefrierschnitten**

Die aufrechte Einbettung der dünnen Segel in das Einfriermedium (Methoden 3.5.3.) war oft sehr schwierig. Das Material taute trotz des Stickstoffdampfes schnell auf und wurde dadurch weich, was dazu führte, dass das schwere Einfriermedium dafür sorgte, dass das Segel sich

umlegte. Daraus resultierte dann, dass die besiedelte Oberfläche nicht senkrecht zur Schnittfläche stand und gegebenenfalls anhaftende Zellen nicht detektiert werden konnten. Außerdem konnte das Antauen selbst bereits zur Artefaktbildung führen. Ebenso bestand die Gefahr, durch die mechanische Manipulation mit einer Pinzette, zum Aufrichten des Segels im Einfriermedium, anhaftende Zellen abzulösen.

## **5.2. Endothelialisierung von Schweineherzklappen**

### **5.2.1. Untersuchung von SKL-Patches (Vorversuche)**

Da die Aufbereitung der Segel schwierig war (Ergebnisse 5.1.2.), wurden die Vorversuche vorwiegend mit Gefäßwandstücken durchgeführt, da bei diesen die zu beschichtende Oberfläche glatt war, die Probenaufbereitung keine Probleme verursachte und die Ergebnisse ohne nennenswerte Artefaktbildung beurteilt werden konnten. Die Fibroblasten- bzw. Endothelzellbesiedelung von SKL-Patches wurde mit jeweils  $1 \pm 0,25 \times 10^6/\text{cm}^2$  Zellen durchgeführt.

#### **5.2.1.1. Inkubation unterschiedlich vorbehandelter SKL-Patches mit konfluenten**

##### **Endothelzellen (Toxizitätstest A)**

Mit diesem Versuch sollte die Frage untersucht werden, ob die GA-fixierten Klappen toxische Mengen ungebundenen Glutaraldehyds freisetzen und ob eine Spülung des Materials auf das Überleben von humanen Endothelzellen Einfluss nehmen würde. Hierzu wurden Patches der Gruppen A bis I (Methoden 3.3.2.) mit konfluenten Endothelzellen inkubiert und deren Überleben untersucht (Endothelialisierungsversuche 4.2.1.1.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammen gefasst.

Tab. 4: Toxizitätstest A

	<b>Gruppe</b>								
	<b>A</b> (n = 3)	<b>B</b> (n = 3)	<b>C</b> (n = 3)	<b>D</b> (n = 3)	<b>E</b> (n = 3)	<b>F</b> (n = 3)	<b>G</b> (n = 3)	<b>H</b> (n = 3)	<b>I</b> (n = 3)
<b>Säure</b>	ohne	ohne	ohne	ohne	ohne	ohne	5%	10%	15%
<b>Spülung</b>	ohne	10 Min NaCl	24 h NaCl	24 h PBS	10 Min M199	24 h M199	24 h M199	24 h M199	24 h M199
<b>survival (24 h)</b>	negativ (--)	negativ (-)	negativ (-)	negativ (-)	negativ (-)	positiv (++)	positiv (++)	positiv (++)	positiv (++)
<b>survival (72 h)</b>	negativ (--)	negativ (-)	negativ (-)	negativ (-)	negativ (-)	positiv (++)	positiv (++)	positiv (++)	positiv (+)
<b>survival (96 h)</b>	negativ (--)	negativ (-)	negativ (-)	negativ (-)	negativ (-)	positiv (++)	positiv (++)	positiv (++)	positiv (+)

Sowohl Gruppe A als auch B zeigten bereits nach 24 h einen zellfreien Bereich von 2,1 cm ( $\pm$  0,7 cm) zwischen Patch und Zellrasen (Abb. 10A). Dieses Ergebnis änderte sich für B auch nach 72 bzw. 96 h nicht. In Gruppe A hatte sich der restliche, konfluente Endothelzellteppich aufgelöst und es zeigten sich nur noch verstreut liegende Einzelzellen und Zelldebris. Die Patches der Gruppe C bis E zeigten ähnliche Daten wie Gruppe B, wobei hier der zellfreie Bereich um den Patch kleiner war (1,3 cm  $\pm$  0,5 cm). Erst die Gruppen, deren Patches 24 h in M199 gespült worden waren (F bis I) zeigten zu keinem Zeitpunkt, egal ob sie vorher mit organischer Säure behandelt worden waren oder nicht, Anzeichen für eine Ablösung der Zellen (Abb. 10B). Allerdings war der Endothelzelllayer bei den mit 15% Säure behandelten Patches nach 72 bzw. 96 h aufgelockert und weniger dicht als zu Beginn der Inkubation.

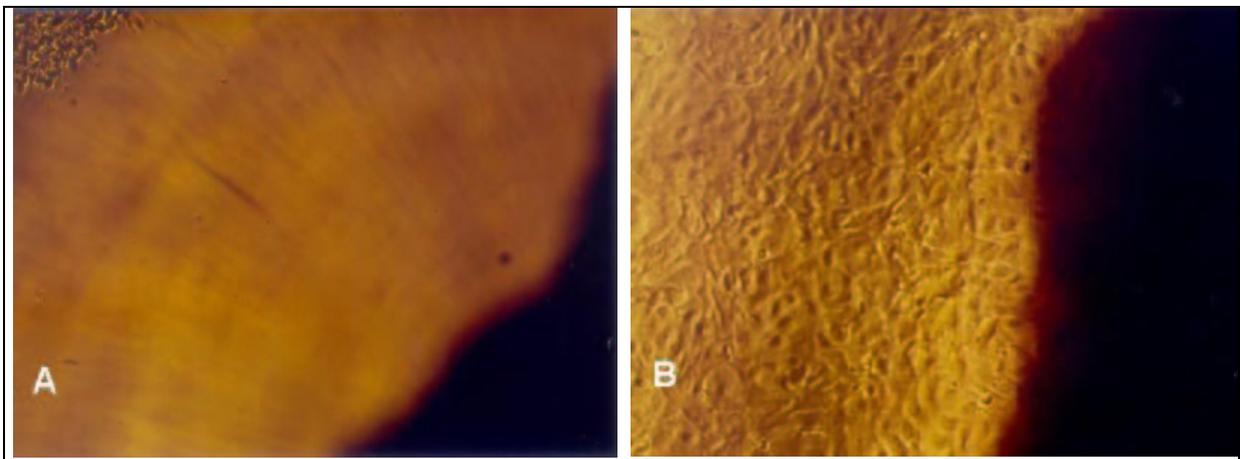


Abb. 10 SKL-Patches auf konfluenten Endothelzellrasen: Im Umkreis um den 10 Min mit NaCl gespülten Patch zeigte sich bereits nach 24-stündiger Inkubationszeit ein zellfreien Bereich rund um das porcine Material (A), während ein mit 10% Zitronensäure behandelter und 24 h mit M199 gespülter Patch auch nach 96 h konfluent von Endothelzellen umgeben war (B).

#### **5.2.1.2. Endothelialisierung unterschiedlich vorbehandelter SKL-Patches mit Endothelzellen (Toxizitätstest B)**

Mit dieser Untersuchung sollte geprüft werden, ob eine Besiedelung der fixierten SKL-Patches mit Endothelzellen von einer vorhergehenden Spülung bzw. von dem verwendeten Spülmedium beeinflusst wurde. Hierzu wurden Patches der Gruppen A bis I (Methoden 3.3.2.) nach unterschiedlichen Spülungen mit Endothelzellen beschichtet (Endothelialisierungsversuche 4.2.1.2.). In Tabelle 5 sind die Ergebnisse zusammen gefasst.

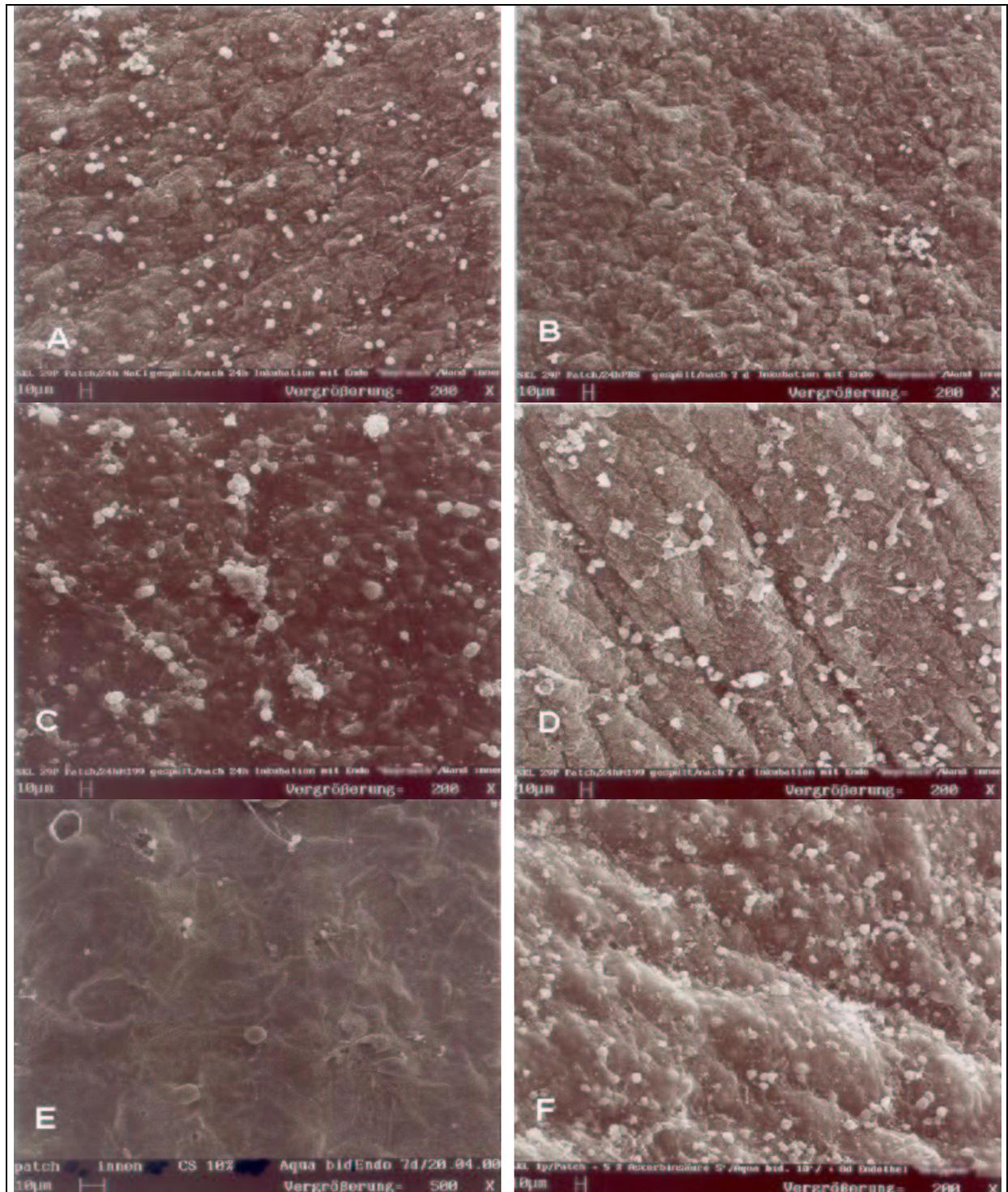
Tab. 5: Ergebnisse von Toxizitätstest B

	Gruppe								
	A (n = 4)	B (n = 4)	C (n = 4)	D (n = 4)	E (n = 4)	F (n = 4)	G (n = 4)	H (n = 4)	I (n = 4)
<b>Säure</b>	ohne	ohne	ohne	ohne	ohne	ohne	5%	10%	15%
<b>Spülung</b>	ohne	10 Min NaCl	24 h NaCl	24 h PBS	10 Min M199	24 h M199	24 h M199	24 h M199	24 h M199
<b>Endothel</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>24 h Endothel- zellinkubation</b>	negativ (- -) 0%	negativ (-) 10%	negativ (-) 10%	negativ (-) 10%	negativ (-) 10%	positiv (+) 75%	positiv (++) >90%	positiv (++) >90%	positiv (+) 75%
<b>7 d Endothel- zellinkubation</b>	negativ (- -) 0%	negativ (- -) 0%	negativ (-) 10%	negativ (- -) 0%	negativ (- -) 0%	negativ (- -) 0%	positiv (++) >90%	positiv (++) >90%	positiv (+) 75%

Die Patches der Gruppe A zeigten weder nach 24 h noch nach 7 Tagen adhärierende Zellen. Die Gruppen B, C und E zeigten nach 24 h Endothelzellinkubation (Abb. 11A) nur verstreut anhaftende Zellen. Nach 7 Tagen hatte sich das Bild für Gruppe C nicht geändert, während bei den Gruppen B und E keine Zellen mehr zu finden waren. Eine 24-stündige Spülung der Patches mit PBS (Gruppe D) führte auch nach 7 Tagen nicht zu einer Zelladhäsion (Abb. 11B). Erst die 24-stündige Spülung mit M199 (Gruppe F) resultierte in einem beinahe konfluenten Endothelzellrasen bei der 24-Stundenprobe, bei dem jedoch viele sphäroide Zellen aufgelagert waren (Abb. 11C). Scheinbar zeigte sich hier bereits eine beginnende Ablösung, denn nach sieben Tagen (Abb. 11D) lagen nur noch verstreut Zellen auf dem Patch. Eine Vorbehandlung jeweils einer Hälfte der Patches mit Zitronen- bzw. Ascorbinsäure, anschließender Spülung in Aqua bidest und Inkubation in M199 (Methoden 3.3.1.) erbrachte die besten Ergebnisse (Gruppe G – I). Bei einer Säurekonzentration von 10% waren die Endothelzellen nach 24 h und nach 7 Tagen konfluent und zeigten keine Auflagerungen (Abb. 11E). Die Daten bei 5 und 15% Säurekonzentration (Gruppe G und I) waren jeweils schlechter. In Gruppe G (Abb. 11F) waren die Proben konfluent besiedelt, zeigten jedoch viele sphäroide Auflagerungen. In Gruppe I waren die Endothelzellen ausgespreizt und bildeten große Zellinseln, wurden aber nicht konfluent und es zeigten sich ebenfalls Auflagerungen.

Eine Untersuchung des Bodens der Gewebekulturplatten nach der Entnahme der letzten Proben zeigte bei den Gruppen F – I eine konfluente Besiedelung mit Endothelzellen, während in den

anderen Gruppen nur noch Zelldebris (Gruppe A) und wenige am Boden anhaftende Zellen (Gruppe B – E) zu sehen waren.



**Abb. 11 Endothelialisierung unterschiedlich gespülter, GA-fixierter SKL-Patches:** Auf Patches der Gruppe C hafteten nach 24-stündiger Inkubation nur vereinzelt Zellen an (A). Ebenso verhielt es sich nach 7 Tagen bei Gruppe D (B). Patches der Gruppe F zeigten eine verbesserte Zelladhäsion (C), die jedoch nicht stabil war (D). Eine Vorbehandlung mit 10% Zitronensäure brachte die besten Besiedelungsergebnisse (E, 500x Vergrößerung). Wurde mit 5% Säure inkubiert, zeigten sich Auflagerungen auf dem konfluenten Zellrasen (F).

### **5.2.1.3. Endothelialisierung säurebehandelter SKL-Patches mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung**

Nach den vorangegangenen Versuchen (5.2.1.1. und 5.2.1.2.) hatte sich heraus kristallisiert, dass eine 24-stündige Spülung von SKL-Patches in M199 den toxischen Effekt des GA-fixierten Materials auf Endothelzellen stark reduzierte. Eine zusätzliche Behandlung der Patches mit 10% ZS ermöglichte sogar eine stabile, konfluente Endothelzellbesiedelung über 7 Tage. Verfolgte man die Endothelzellbeschichtung solcher Patches der Gruppe H (Methoden 3.3.2.) über mindestens 14 Tage, war jedoch zu beobachten, dass sich die Zellen zum Großteil ablösten (Abb. 12A).

Deshalb wurde untersucht, ob eine Vorbeschichtung mit autologen Fibroblasten eine mindestens 14-tägige konfluente Endothelialisierung ermöglichte. Hierzu wurde die Zellbesiedelung von Patches der Gruppen H und O (Methoden 3.3.2.) miteinander verglichen (Endothelialisierungsversuche 4.2.1.3.). Das Ergebnis ist in Tabelle 6 zusammen gestellt.

Tab 6: Endothelialisierung säurebehandelter SKL-Patches mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung

	<b>Gruppe H</b> (n = 4)	<b>Gruppe O</b> (n = 4)
<b>Säure</b>	10%	10%
<b>Spülung</b>	24 h M199	24 h M199
<b>Fibroblasten/Zellzahl</b>	—	$1 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$
<b>Endothelzellen/Zellzahl</b>	$1 \pm 0,3 \times 10^6/\text{cm}^2$	$1 \pm 0,3 \times 10^6/\text{cm}^2$
<b>24 h Endothelzellinkubation</b>	positiv (+) 70%	positiv (+) 80%
<b>7 d Endothelzellinkubation</b>	positiv (++) > 95%	positiv(++) > 95%
<b>14 d Endothelzellinkubation</b>	positiv (+) 60%	positiv (++) > 95%
<b>21 d Endothelzellinkubation</b>	negativ (-) < 10%	positiv (++) 85%

Nach 24-stündiger Inkubation zeigten sich im REM bei beiden Gruppen viele große Zellinseln, die nach sieben Tagen konfluent waren. Jedoch waren nur Patches, die mit Fibroblasten vorbeschichtet worden waren, sowohl nach 14 (Abb. 12B) als auch nach 21 Tagen immer noch von einem konfluenten Zellrasen bedeckt. Nach 21 Tagen traten z.T. kleinere Lücken auf ( $< 300 \mu\text{m}$ ). Die Patches der Gruppe H zeigten nach 21 Tagen reiner Endothelzellinkubation keine adhärierenden Zellen mehr.

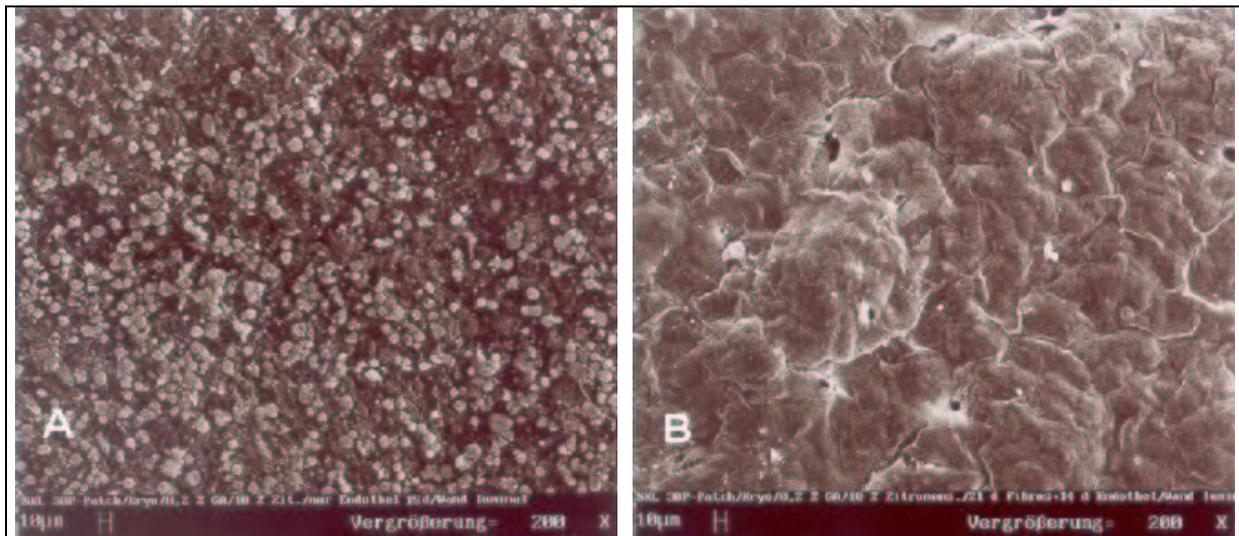


Abb. 12 Endothelialisierte säurebehandelte SKL-Patches nach 14-tägiger Inkubation: Ohne Fibroblastenvorbeschichtung zeigten sich vorwiegend abgekugelte Zellen auf der Lumenoberfläche (A), während nach Fibroblastenbesiedelung ein konfluenter Endothelzellrasen entstanden war (B).

#### **5.2.1.4. Vergleich der Endothelialisierung zitronen- bzw. ascorbinsäurebehandelter Patches**

Nachdem die Daten zur Endothelialisierung zitronensäurebehandelter SKL-Patches nach vorausgegangener Fibroblastenbeschichtung (Ergebnisse 5.2.1.3.) sehr vielversprechend waren, sollte mit diesem Versuch überprüft werden, ob sich dieses Ergebnis durch die Verwendung von Ascorbinsäure verändert würde. Daher wurden endothelialisierte Patches der Gruppen N und O (Methoden 3.3.2.) miteinander verglichen (Endothelialisierungsversuche 4.2.1.4.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Vergleich der Endothelialisierung mit Fibroblastenvorbeschichtung nach der Verwendung von Ascorbin- bzw. Zitronensäure

	<b>Gruppe N</b> (n = 4)	<b>Gruppe O</b> (n = 4)
<b>Säure</b>	Ascorbinsäure (10%)	Zitronensäure (10%)
<b>Spülung</b>	24 h M199	24 h M199
<b>Fibroblasten Zellzahl</b>	$1 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$	$1 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$
<b>Endothelzellen Zellzahl</b>	$1 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$	$1 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$
<b>24 h Fibroblasten-inkubation</b>	positiv (+) $74 \pm 4,8\%$	positiv (+) $70 \pm 8,2\%$
<b>7 d Endothelzell-inkubation</b>	positiv (++) $85 \pm 9,1\%$	positiv (++) $90 \pm 7,1\%$

Beide Gruppen zeigten nach 24-stündiger Inkubation mit Fibroblasten am REM deutlich adhärierende Zellen, wobei diese einzeln und auch in Zellverbänden ca. zwei Drittel der Lumenoberfläche der jeweiligen Probe bedeckten. Nach 7-tägiger Endothelzellinkubation (14 Tage Gesamtinkubation) waren die Patches beider Gruppen nahezu konfluent bedeckt. Die Endothelzellen zeigten das für sie typische Pflastersteinmuster (Abb. 13).

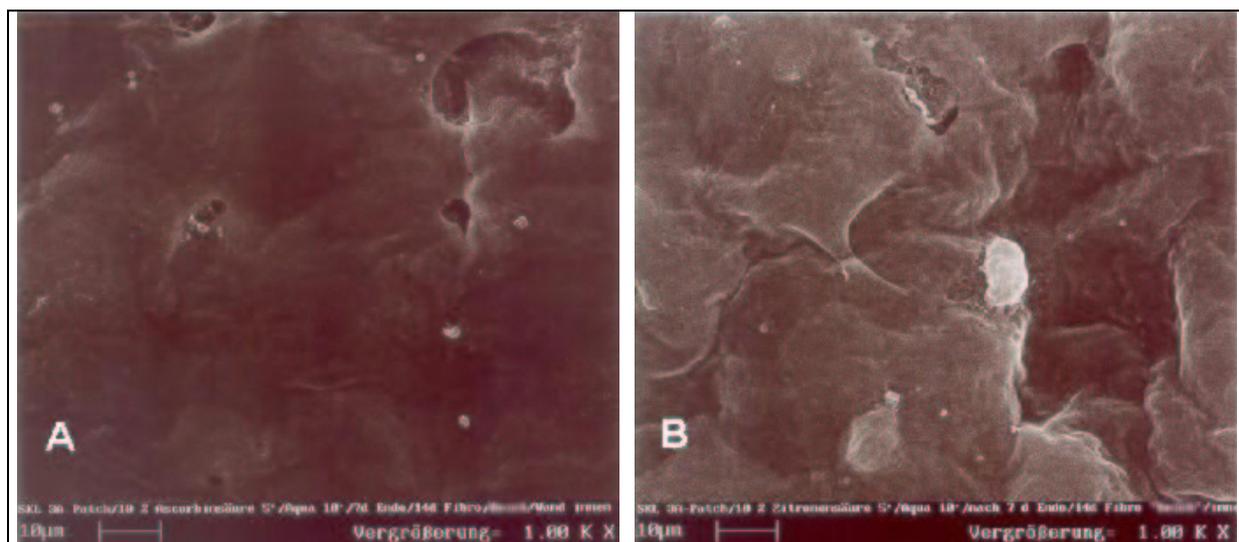


Abb. 13 SKL-Patches nach 14-tägiger Fibroblasten- und 7-tägiger Endothelzellinkubation: Auf dem Lumen der Patches zeigte sich die Pflastersteinmorphologie von Endothelzellen unabhängig davon, ob dieses vor der Besiedelung mit 10% Ascorbin- (A) oder mit Zitronensäure (B) vorbehandelt worden war. Vergrößerung 1000x

#### **5.2.1.5. Endothelialisierung säurebehandelter SKL-Patches mit PKH26-gefärbten Zellen**

Ziel der Beschichtung mit gefärbten Zellen war, artifiziell aufgebrachte markierte Zellen von potentiell regenerierten porcinen Zellen unterscheiden zu können. Zu diesem Zweck wurden Patches der Gruppen J und K (Methoden 3.3.2.) am REM und am PKM untersucht (Endothelialisierungsversuche 4.2.1.5.)

Die zur Beschichtung der Patches verwendeten Fibroblasten (Abb. 14A) bzw. Endothelzellen (Abb. 14B) zeigten in der Kultur bei einer Wellenlänge von 560 nm eine eindeutige Rotfärbung des Zytoplasmas im Gegensatz zu ungefärbten Zellen. Bei Gruppe K wurden in zwei von vier Fällen sowohl am REM als auch am PKM Zellen gefunden. Die Untersuchung der Wandstücke zeigte am REM eine partielle Besiedelung. Auf den Gefrierschnitten waren die roten (= positiven) Zellen z.T. sehr verstreut zu detektieren. Da Fibroblasten zur Bildung von mehrschichtigen Strukturen neigen, ist es möglich, dass manche Schnitte zellfrei waren und andere wiederum positiv. In der Gruppe J war die Auswertung durch die Einschichtigkeit der Endothelzellen eindeutiger, da keine zellfreien Lücken auftraten, die bei den Gefrierschnitten ein falsch negatives Ergebnis vortäuschen konnten. Hier gelang auch die Aufbereitung der Segelproben für die Schnitte einwandfrei. Die im REM detektierten Zellen (Abb. 14C) konnten durch den Fluoreszenznachweis des PKH26 (Abb. 14D) eindeutig als die aus der Kultur stammenden identifiziert werden. Beide endothelialisierten Segelproben waren auch auf der Seite besiedelt, die in der Kulturschale unten gelegen hatte. Dies sprach für eine passive Besiedelung der aufgebrachten Zellen während der Inkubation.



In drei Fällen konnte die Adhäsion nicht ausgewertet (= n.a.) werden, da die Zellen im Überstand nicht resuspendiert werden konnten.

Tab. 8: Übersicht der Zellbesiedlung der als ganzes verwendeten porcinen Herzklappen

Versuch	SKL	Beschichtung	
		Fibroblasten (Adhäsion)	Endothelzellen (Adhäsion)
4.2.2.1.	1	nein	2,3 x 10 <sup>7</sup> (81%)
	2	nein	2,6 x 10 <sup>7</sup> (73%)
	3	2,9 x 10 <sup>7</sup> (79%)	4,2 x 10 <sup>7</sup> (89%)
	4	3,7 x 10 <sup>7</sup> (78%)	6,0 x 10 <sup>7</sup> (n.a.)
	5	nein	3,9 x 10 <sup>7</sup> (91%)
	6	nein	3,1 x 10 <sup>7</sup> (84%)
	7	2,1 x 10 <sup>7</sup> (n.a.)	3,7 x 10 <sup>7</sup> (93%)
	8	1,4 x 10 <sup>7</sup> (89%)	4,3 x 10 <sup>7</sup> (91%)
4.2.2.2.	9	nein	2,7 x 10 <sup>7</sup> (94%)
	10	nein	4,4 x 10 <sup>7</sup> (97%)
	11	nein	2,4 x 10 <sup>7</sup> (93%)
	12	2,8 x 10 <sup>7</sup> (78%)	2,6 x 10 <sup>7</sup> (68%)
	13	1,6 x 10 <sup>7</sup> (97%)	10,8 x 10 <sup>7</sup> (97%)
	14	4,0 x 10 <sup>7</sup> (98%)	5,6 x 10 <sup>7</sup> (91%)
	15	5,4 x 10 <sup>7</sup> (89%)	9,8 x 10 <sup>7</sup> (99%)
	16	1,0 x 10 <sup>7</sup> (n.a.)	12 x 10 <sup>7</sup> (93%)
4.2.2.3.	17	3,0 x 10 <sup>7</sup> (99%)	1,8 x 10 <sup>7</sup> (96%)
	18	2,1 x 10 <sup>7</sup> (90%)	1,3 x 10 <sup>7</sup> (92%)

### **5.2.2.1. Endothelialisierung von Schweineherzklappen nach unterschiedlicher Spülung**

Zunächst wurde untersucht, ob die Ergebnisse des Versuchs 5.2.1.2. auf ganze Klappen übertragbar wären. Auf Grund der Daten dieser Patchversuche wurde die Untersuchung auf vier Gruppen eingeschränkt: Je zwei SKL aus den Gruppen B, F, L und M (Methoden 3.3.2.) wurden miteinander verglichen. Bei zwei Beschichtungen konnte die primäre Zelladhäsion (Endothelialisierungsversuche 4.1.2.) nicht ausgewertet werden. Die Ergebnisse der REM Beurteilung (Endothelialisierungsversuche 4.2.2.1.) sind in Tabelle 9 zusammen gefasst.

Tab. 9 Vergleich unterschiedlicher Spülungen auf die Beschichtbarkeit von GA-fixierten Schweineherzklappen

	<b>Gruppe</b>			
	<b>B</b> (n = 2)	<b>F</b> (n = 2)	<b>L</b> (n = 2)	<b>M</b> (n = 2)
<b>Säure</b>	nein	nein	nein	nein
<b>Spülung</b>	10 Min NaCl	24 h M199	10 Min NaCl	24 h M199
<b>Fibroblasten/ Zellzahl</b>	nein	nein	1,0 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup> 1,5 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	0,6 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup> 1,0 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>
<b>Primäre Zelladhäsion nach 24 h</b>	—	—	78% 79%	89% n.a.
<b>Endothelzellen/ Zellzahl</b>	1,3 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup> 1,2 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	1,4 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup> 1,4 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	2,8 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup> 2,1 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	2,1 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup> 1,8 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>
<b>Primäre Zelladhäsion nach 24 h</b>	73% 81%	91% 84%	n.a. 89%	91% 93%
<b>24 h Fibroblasten- inkubation</b>	—	—	positiv (+) 45%	positiv (+) 70%
<b>24 h Endothelzell- inkubation</b>	negativ (- -)	negativ (-) 24%	negativ (-) 26%	positiv (+) 72%
<b>7 d Endothelzell- inkubation</b>	negativ (- -)	negativ (-) 30%	negativ (-) 25%	positiv (++) 80%
<b>14 d Endothelzell- inkubation</b>	negativ (- -)	positiv (+) 40%	negativ (-) 25%	positiv (++) 80%
<b>21 d Endothelzell- inkubation</b>	negativ (- -)	positiv (+) 40%	negativ (-) 25%	positiv (++) 80%

In der mit NaCl gespülten Gruppe zeigten nur die mit Fibroblasten vorbeschichteten SKL (Gruppe L) eine partielle Besiedelung mit Endothelzellen. Die Zellinseln bedeckten bis zum 21. Tag der Inkubation insgesamt ca. 25% der jeweiligen Wandprobe (Abb. 15B). Die letzte Segelprobe, die aus dieser Gruppe am 14. Tag entnommen wurde, zeigte auf beiden Seiten ebenfalls eine partielle Besiedelung. Ohne die Fibroblasten (Gruppe B), waren bereits auf den an Tag 7 bzw. 10 (Abb. 15A) entnommenen Wand- und Segelproben keine Zellen mehr zu sehen. Der immunhistochemische Nachweis für das Faktor VIII Antigen bzw. CD31 (Methoden 3.3.6.) zeigte verstreut liegende rotgefärbte Zellen, was bestätigte, dass die anhaftenden Zellen human und vital waren. Laminin und Kollagen IV konnten nicht nachgewiesen werden. Bei den

Proben der Gruppe L konnten verstreut liegende positiv gefärbte Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis für Kollagen IV war positiv und es zeigte sich eine schwache Expression von CD90 und Prolyl-4-Hydroxylase. Laminin konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

Die vier Klappen, die mit M199 gespült wurden (Gruppen F und M), zeigten eine Anhaftung ausgespreizter Zellen, die in vielen kleineren Inseln auf der jeweiligen Probe verteilt lagen. Die Adhäsion der Fibroblasten nach 24 h lag bei Gruppe M mit 70% bedeckter Fläche deutlich über der Besiedelung mit Endothelzellen der Gruppe F nach gleich langer Inkubationsdauer. In dieser Gruppe zeigte sich auch nach 21 Tagen kein konfluenter Endothelzellrasen, aber die Zellen waren morphologisch einwandfrei (Abb. 15C) und zeigten sich in der immunhistochemischen Färbung für Faktor VIII (Abb. 15E) und CD31 positiv. Der Nachweis für Laminin bzw. Kollagen IV war ebenfalls positiv, jedoch schwach ausgeprägt. Auch die Endothelzellen der Gruppe M zeigten eine Expression von Faktor VIII Antigen, CD31 (Abb. 15F), Kollagen IV und Laminin. Die Zellen, die mit dem CD90 Antikörper reagierten, waren deutlich gefärbt. Sie lagen unter dem nicht gefärbten Endothelzellteppich verstreut. Die Zellen hatten sich am 21. Tag nach der Endothelzellinkubation (28 Tage Gesamtinkubationszeit) zu einem großen Zellteppich ausgebreitet (Abb. 15D), der allerdings in sich nicht vollständig dicht schien. Die am 14. Tag nach dem Aufbringen der Endothelzellen entnommenen Segelproben waren sowohl aortal als auch ventrikulär sehr partiell (Gruppe F) bzw. dicht (Gruppe M) von Zellen bedeckt.

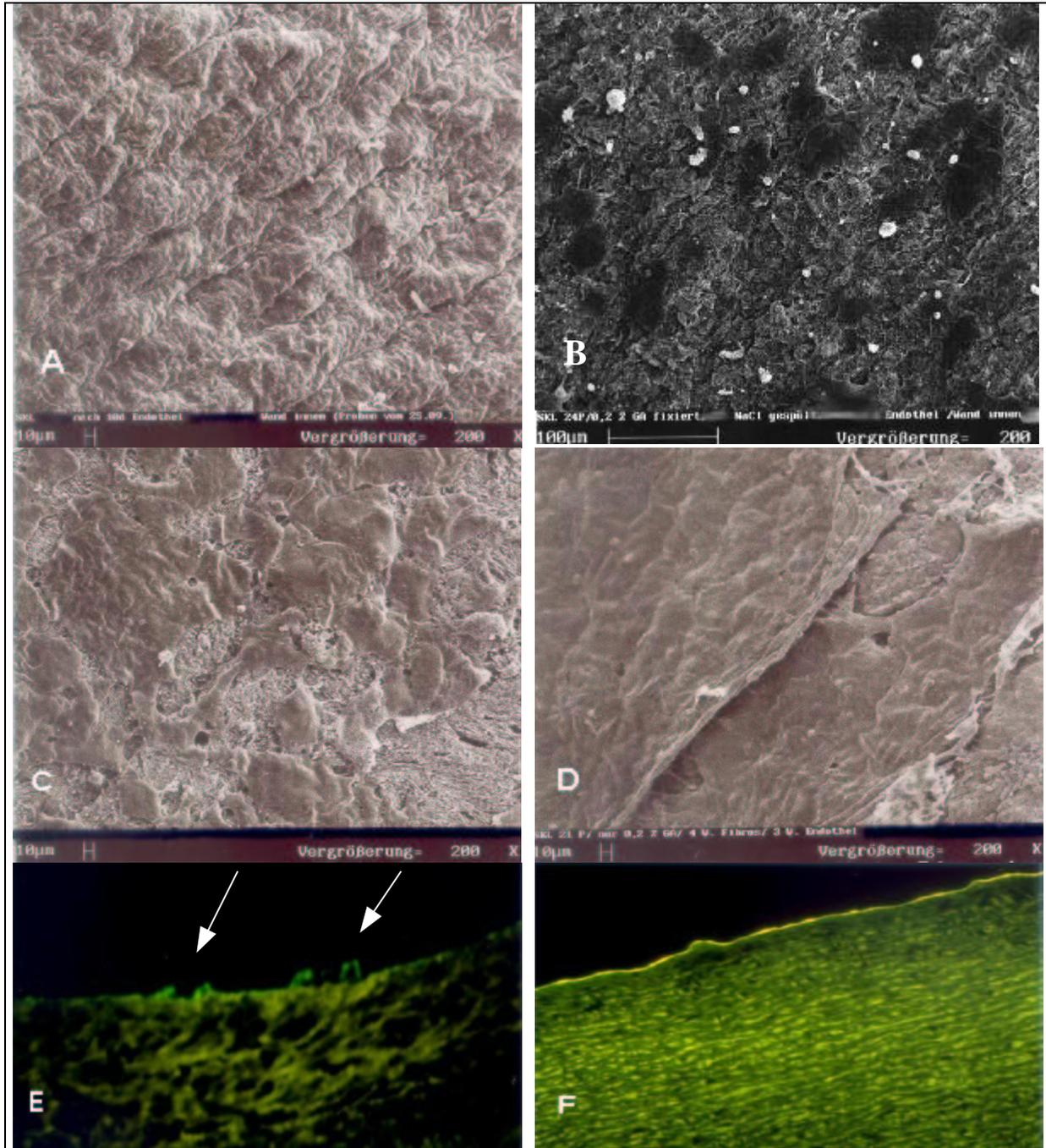


Abb. 15 Endothelialisierung von NaCl bzw. M199 gespülten SKL: 10 Min NaCl gespülte SKL zeigten nach spätestens 10 Tagen keine Zellbesiedelung mehr (A). Wurden sie vorab mit Fibroblasten besiedelt, dann zeigten sich auch am 21. Tag nach Endothelzellinkubation noch Zellinseln (B). Spülte man die SKL 24 h mit M199, bevor man sie mit Endothelzellen besiedelte, verbesserte sich die Zelladhäsion (C) und wurde fast konfluent, wenn zusätzlich Fibroblasten vorbeschichtet worden waren (D). Der Nachweis mit FITC-markiertem Anti-Faktor VIII-AK bzw. CD31 war nach 21-tägiger Endothelzellinkubation auf den Wandproben ohne (E) und mit Fibroblastenvorbeschichtung (F) positiv, wobei die Zellen im ersten Fall lockerer auf der Matrix aufzuliegen schienen (Pfeile).

**5.2.2.2. Endothelialisierung säurebehandelter Schweineherzklappen mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung**

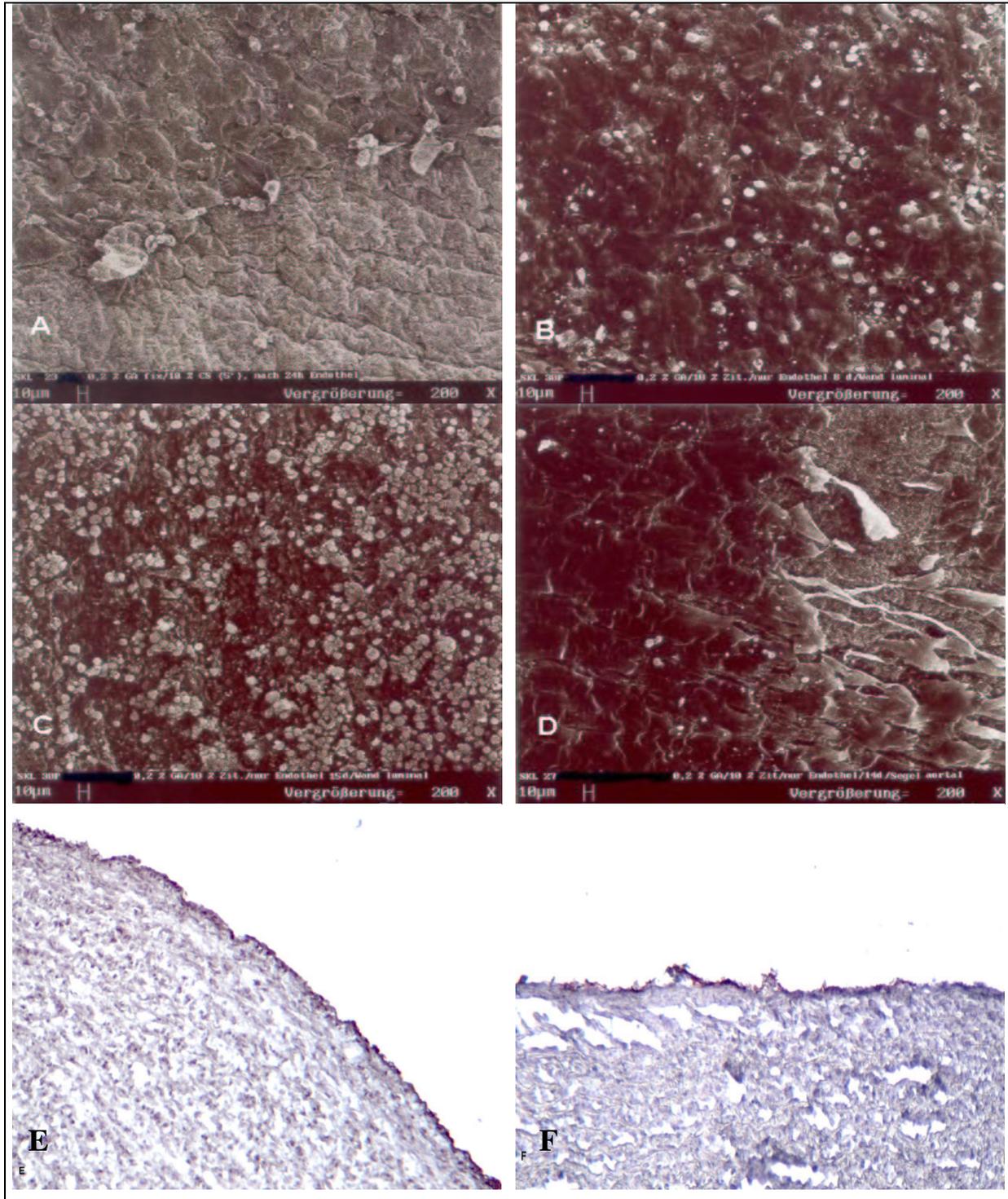
Nachdem die Patchversuche eine deutlich verbesserte Zellanhaftung nach vorangegangener Säurebehandlung zusätzlich zur Fibroblastenvorbeschichtung gezeigt hatten (Ergebnisse 5.2.1.3.), sollten diese Daten durch die Untersuchung ganzer Herzklappen verifiziert werden. Deshalb wurden endothelialisierte SKL der Gruppen H und O (Methoden 3.3.2.) miteinander verglichen (Endothelialisierungsversuche 4.2.2.2.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Endothelialisierung säurebehandelter SKL mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung

	<b>Gruppe H</b> (n = 3)	<b>Gruppe O</b> (n = 5)
<b>Säure</b>	10% Zitronensäure	10% Zitronensäure
<b>Spülung</b>	24 h M199	24 h M199
<b>Fibroblasten/Zellzahl</b>	nein	$0,8 \pm 0,6 \times 10^6/\text{cm}^2$ )
<b>Adhäsion nach 24 h</b>	—	87,4% ( $\pm 10,6$ )
<b>Endothelzellen/Zellzahl</b>	$0,9 \pm 0,3 \times 10^6/\text{cm}^2$	$2,1 \pm 1,0 \times 10^6/\text{cm}^2$
<b>Adhäsion nach 24 h</b>	$94,7\% \pm 2,1$	$89,8\% \pm 12,7$
<b>24 h Fibroblasteninkubation</b>	—	positiv (+) $68\% \pm 17,9$
<b>24 h Endothelzellinkubation</b>	positiv (+) $43,3\% \pm 7,6$	positiv (++) $93\% \pm 5,7$
<b>7/8 d Endothelzellinkubation</b>	positiv (+) $55\% \pm 30,4$	positiv (++) $91\% \pm 4,2$
<b>14/15 d Endothelzellinkubation</b>	positiv (+) $50\% \pm 8,7$	positiv (++) $92\% \pm 15,2$
<b>21/23 d Endothelzellinkubation</b>	positiv (+) $46,7\% \pm 15,3$	positiv (++) $90\% \pm 14,1$
<b>&gt;23 d Endothelzellinkubation</b>	nicht nachverfolgt	positiv (++) $95\% \pm 3,7$ (n = 3)

Nach 24-stündiger Inkubation zeigten sich in Gruppe H  $8,7\% \pm 6,7$  der primär aufgebrauchten Zellen im Zellüberstand, was für eine gute Anhaftung der Zellen an das porcine Material sprach und anhand der REM Daten bestätigt wurde (Abb. 16A): Die Gefäßwandproben der SKL 9 bis 11 waren zu 45%, 35% bzw. 45% mit großteils ausgespreizten Zellen bedeckt. Die zwei entnommenen Segelproben waren ebenfalls partiell bedeckt, wobei eine prozentuale Beurteilung auf Grund von Bruchartefakten und der welligen Struktur des porcinen Materials nicht möglich war (Ergebnisse 5.1.2.1.). Nach 7 bzw. 14 Tagen waren SKL 9 und 10 partiell beschichtet (35 bzw. 40% bedeckte Oberfläche) und SKL 11 war nach 8-tägiger Inkubation beinahe konfluent besiedelt (Abb. 16B), wobei viele sphäroide Auflagerungen zu sehen waren. Diese Klappe zeigte nach 15 Tagen Endothelzellinkubation ein Ablösen der Zellen (Abb. 16C), während die SKL 9 und 10 nach wie vor eine partielle Beschichtung der Wand- und Segelproben (Abb. 16D) aufwiesen. Nach 21-tägiger Inkubation zeigten alle drei Klappen keine nennenswerten Veränderungen zu den 14-Tage-Proben.

Die besiedelte Fläche lag für die Klappen 9 und 10 bei 50 bzw. 60%, für Klappe 11 nur noch bei 30%, was zu einer durchschnittlich besiedelten Fläche von  $46,7\% \pm 15,3$  führte. Die abgekugelten Zellen waren verschwunden und die adhärierenden Zellen waren ausgespreizt und morphologisch einwandfrei. Die immunhistochemischen Untersuchungen der Proben zeigte ab dem 7. (8.) Tag eine schwache Färbung der oberen Matrix nach der Inkubation mit Kollagen IV AK (Abb. 16E). Eine partielle Besiedelung aller drei SKL mit vitalen Endothelzellen am 21. Tag der Inkubation, konnte durch den positiven Nachweis von CD31 (Abb. 16F) und Faktor VIII auf allen Wand- und Segelproben nachgewiesen werden. Laminin war nur auf SKL 9 und 10 schwach nachweisbar.



**Abb. 16 Endothelialisierung von SKL nach 10% Säurebehandlung:** Die primäre partielle Zellanhaftung (A) resultierte nach 8-tägiger Inkubation in einer fast konfluenten Endothelzellbesiedelung (B), die sich jedoch nach weiterer Inkubation löste (C). SKL 10 zeigte zu diesem Zeitpunkt eine partielle Zellanhaftung auf den Segeln ohne sphäroide Auflagerungen (D). Die Nachweis für Kollagen IV (E) und CD31 (F) war positiv.

In Gruppe O zeigte die primäre Adhäsion, die durch die Zählung der Zellen im Überstand nach 24-stündiger Inkubation nach Fibroblasten- und Endothelzellbeschichtung überprüft wurde, eine relativ starke Streuung (Fibroblasten bzw. Endothelzellen im Überstand:  $12,6\% \pm 10,6$  bzw.  $10,2\% \pm 12,7$ ), wobei mindestens 68% und maximal 99% der Zellen adhären waren (Tabelle 8). Bei der Besiedelung von SKL 16 konnten die Fibroblasten im Überstand nicht resuspendiert werden. Die aufgebrauchten Zellen verteilten sich so, dass die Fläche der Wandproben, die nach der ersten Zellinkubation entnommen wurden, durchschnittlich zu  $68\% \pm 17,9$  mit Fibroblasten bedeckt waren (45, 70, 65, 95 und 65%), wobei SKL 15 auf der untersuchten Gefäßwandprobe (Abb. 17A) fast konfluente Besiedelung zeigte. Die Wandproben, die direkt vor der Endothelialisierung der Klappen entnommen wurden, zeigten bei den SKL 12 bis 14 und SKL 16 eine nahezu konfluente Besiedelung, wobei die Fibroblasten z.T. übereinander lagen. Bei SKL 15 waren jedoch nur noch abgekugelte Zellen zu sehen. Diese SKL war nach der Inkubation mit Endothelzellen nach 24 h und 7 Tagen konfluent mit Zellen besiedelt. Am 14. und 23. Tag nach der Endothelzellinkubation war nur noch eine partielle Besiedelung (65%) zu finden (Abb. 17B). Die Segelprobe war zu diesem Zeitpunkt noch konfluent mit Endothelzellen bedeckt (Abb. 17C).

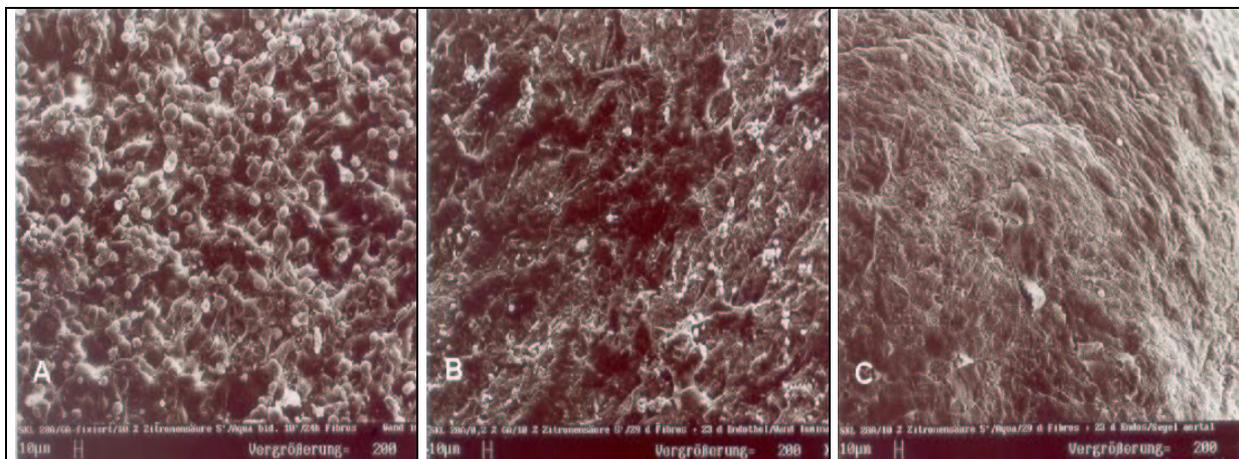


Abb. 17 Endothelialisierung der säurebehandelten SKL 15 nach Fibroblastenbesiedelung: Nach 24-stündiger Fibroblasteninkubation zeigte die Wand von eine konfluente Besiedelung (A), nach 23-tägiger Inkubation mit Endothelzellen war die Beschichtung nur noch partiell (B), während die Segelprobe aortal (C) noch zu >95% besiedelt war.

Die Segelproben von SKL 13 und 14 wurden an Tag 14 und 20 nach der Endothelzellinkubation ausgewertet und zeigten sowohl aortal als auch ventrikulär einen konfluenten Zellrasen. Die immunhistochemische Untersuchung war bei allen entnommenen

Segelproben für Faktor VIII (Abb. 18A), CD31, Laminin und Kollagen IV positiv. Fibroblasten konnten immunhistochemisch vor und nach (Abb. 18B) der Besiedelung mit Endothelzellen detektiert werden.

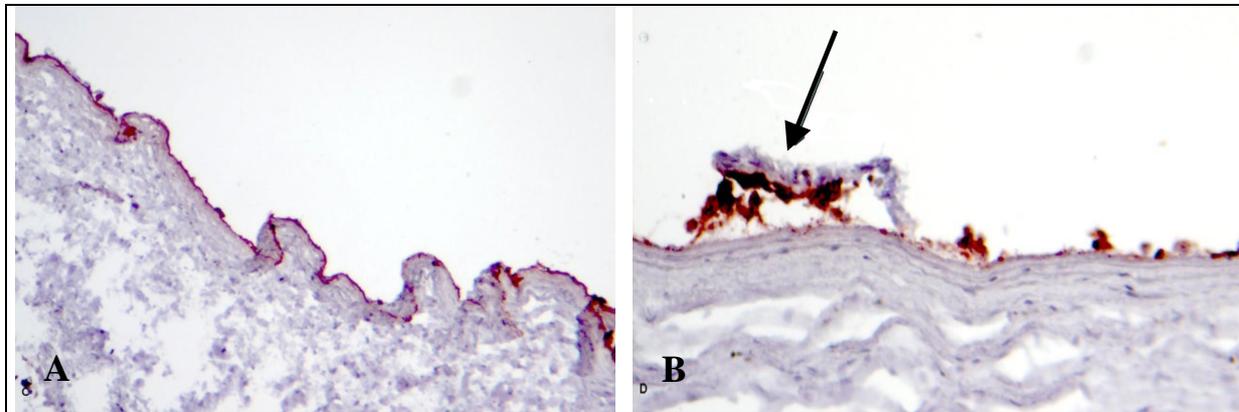


Abb. 18 Immunhistochemische Nachweise auf Segelproben von säurebehandelten, fibroblastenvorbeschichteten SKL: Der Nachweis des Faktor VIII Antigens (A) war ebenso positiv, wie der für Thy-1 (B), was an den rot gefärbten Zellen zu erkennen war. Man erkannte deutlich die über den Fibroblasten liegenden, mit Hämalaun blau gefärbten aber für Thy-1 negativen Zellen (Pfeil).

Bei SKL 12 wurde 35 Tage nach dem Aufbringen der Endothelzellen die letzte Segelprobe entnommen und bei SKL 16 nach 45 Tagen. Zu diesen Zeitpunkten zeigte sich der Zellrasen nicht mehr konfluent, doch die Zellen waren morphologisch einwandfrei und konnten als Fibroblasten (Abb. 19A) bzw. Endothelzellen (Abb. 19B) identifiziert werden. Zum Teil lagen die Endothelzellen noch in Zellinseln auf dem Segel. Die immunhistochemische Untersuchung für Faktor VIII, Kollagen IV und CD90 zeigte nur noch verstreute positive Zellen. Dieses Ergebnis korrelierte mit der partiellen Besiedelung, die sich anhand der REM Daten gezeigt hatte.

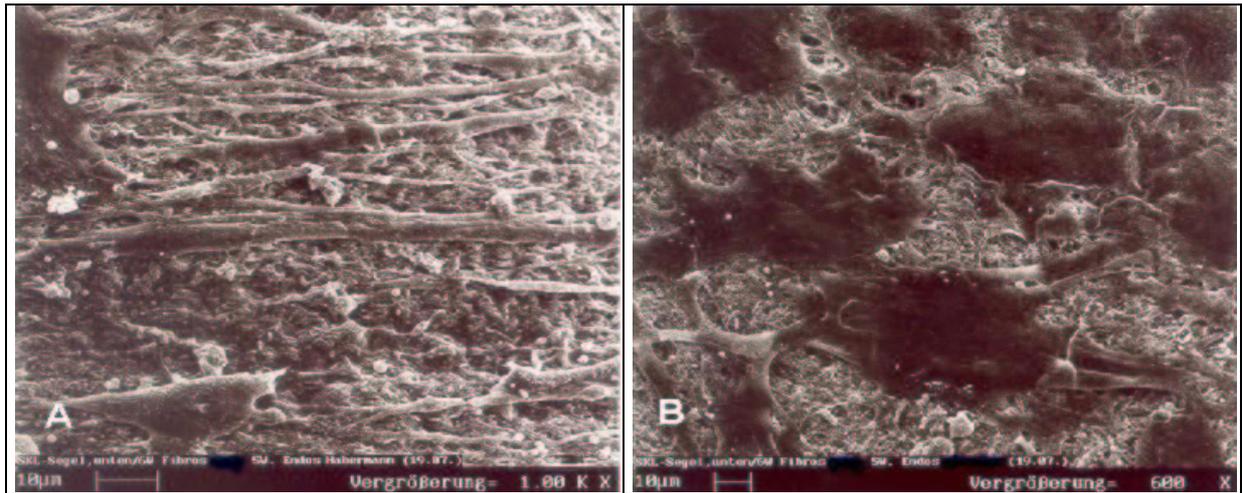
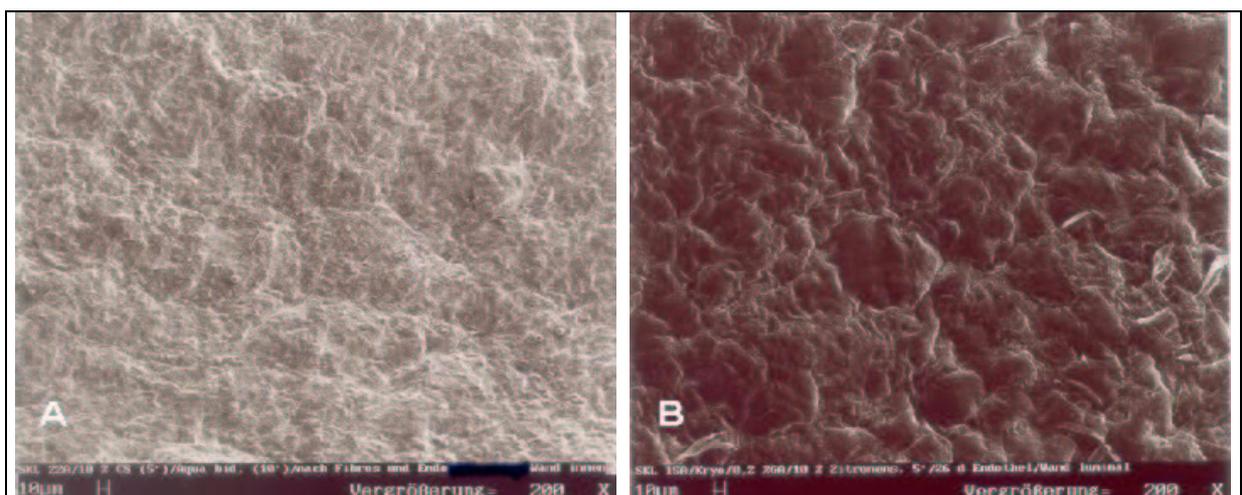
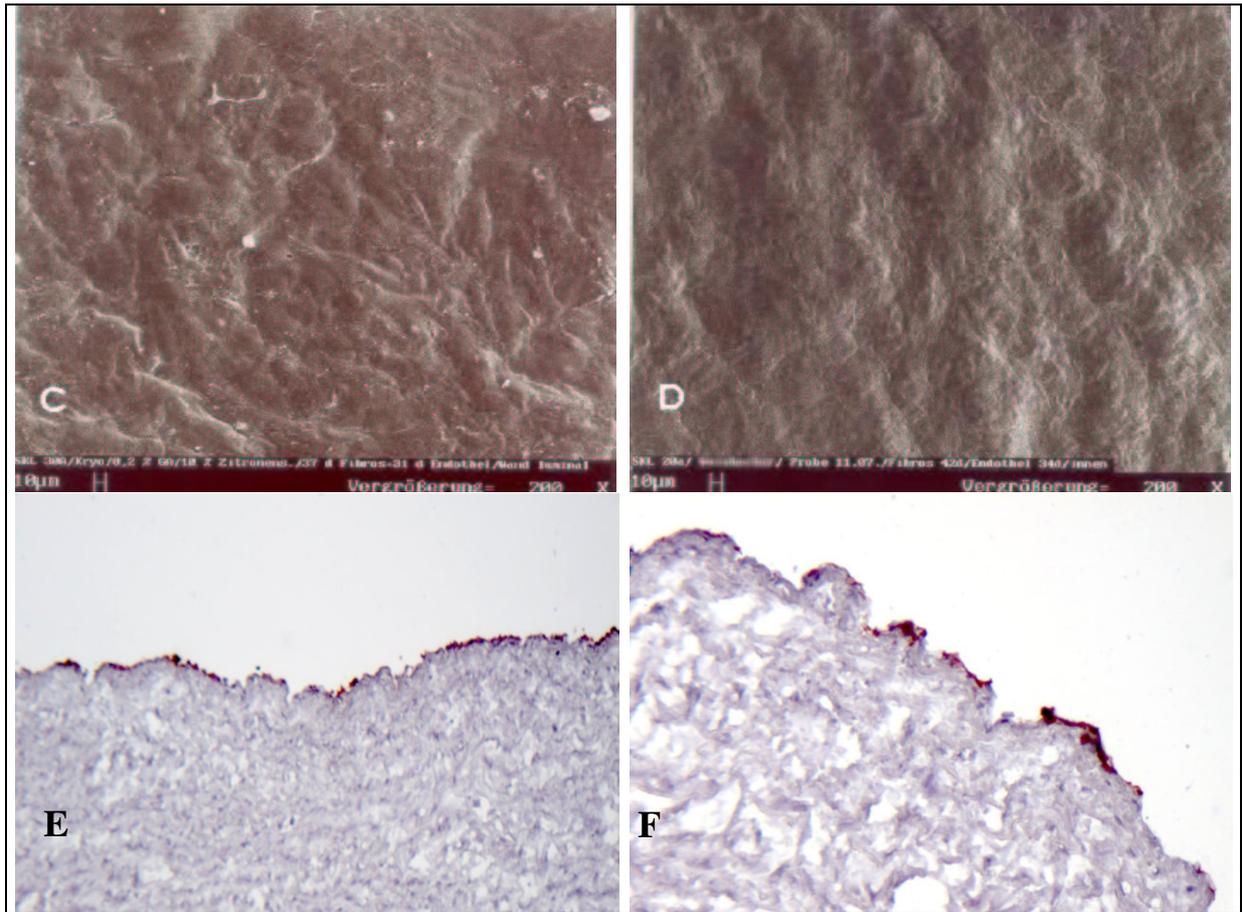


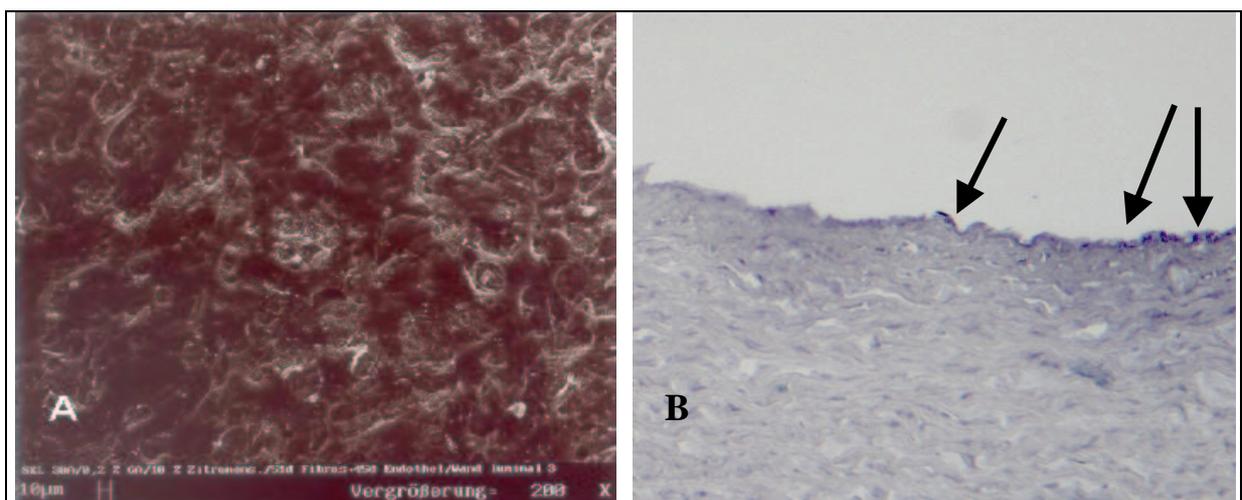
Abb. 19 Segelproben von säurebehandelten, fibroblastenvorbeschichteten SKL nach 42-tägiger Gesamtinkubation: Man sah vereinzelt auf der Segeloberfläche anhaftende Fibroblasten, die deutlich durch ihre längliche Spindelform zu erkennen waren (A). Endothelzellen (B) zeigten sich morphologisch unauffällig. Vergrößerung wie in den Abbildungen angegeben.

Die Überprüfung der Gefäßwandproben von SKL 12 bis 14 und SKL 16 zeigte 20 bzw. 21 Tage nach der Inkubation mit Endothelzellen eine konfluente Beschichtung (Abb. 20A), die auch nach 26, 31 und 34 Tagen lückenlos und morphologisch einwandfrei war (Abb. 20B – D). Über diesen Zeitpunkt hinaus wurde nur noch die Besiedelung von SKL 16 verfolgt. Die Vitalität der Zellen wurde durch positive Färbung für CD 31 und Faktor VIII (Abb. 20E) nachgewiesen. Außerdem konnten Laminin (Abb. 20F) und Kollagen IV nachgewiesen werden.





**Abb. 20** Gefäßwandproben von säurebehandelten, fibroblastenvorbeschichteten SKL: Konfluente Endothelzellbesiedelung nach 21-, 26-, 31- und 34-tägiger Inkubationszeit nach Endothelzellauftrag (A – D). Die Zellen erwiesen sich als human und vital, da die Expression von Faktor VIII (E) und Laminin (F) durch die positive Rotfärbung der Zellen nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 21** Endothelialisierung von SKL 16: Am 51. Tag der Gesamtinkubation waren am REM noch 75% des Lumens mit morphologisch einwandfreien Endothelzellen besiedelt (A). Die immunhistochemische Färbung für humanes Faktor VIII-Antigen zeigte verstreute positiv gefärbte Zellen (B, Pfeile).

Die letzte Probe, die am 51. Tag der Gesamtkubation von SKL 16 entnommen wurde, zeigte noch 75% Besiedelung mit vitalen Zellen (Abb. 21A). Diese Beobachtung wurde durch den positiven immunhistochemischen Nachweis von CD 31, Faktor VIII (Abb. 21B) und CD90 unterstützt. Kollagen IV und Laminin konnten zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden.

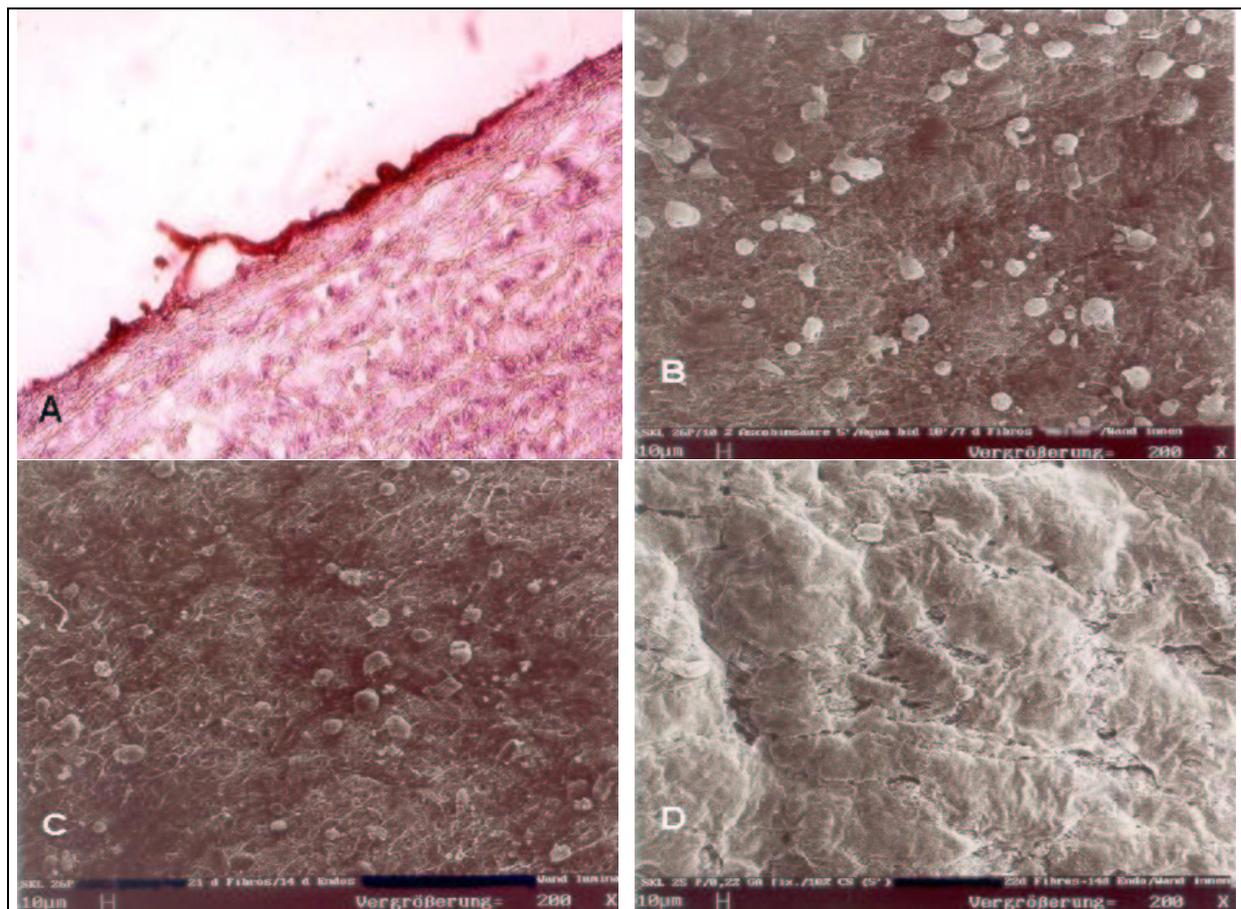
### **5.2.2.3. Endothelialisierung einer kryo- und einer nicht kryopräservierten SKL**

Die im Versuch 5.2.2.2. beschriebene SKL 15, war die einzige Klappe, die trotz Fibroblastenvorbeschichtung nach 16-tägiger Endothelzellinkubation nur noch partielle Zellbesiedelung zeigte. Diese Klappe war nicht kryopräserviert (Methoden 3.2.2.) worden. Es stellte sich nun die Frage, ob dies einen Einfluss auf das Endothelialisierungsergebnis hatte. Zur Überprüfung wurde die Gruppe P (Methoden 3.3.2.) eingeführt und die Endothelialisierung von SKL 18 aus dieser Gruppe mit der kryopräservierten SKL 17 (Gruppe O) verglichen (Endothelialisierungsversuche 4.2.2.3.) und die Ergebnisse in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tab. 11: Endothelialisierung einer kryo- und einer nicht kryopräservierten SKL

	<b>Gruppe O</b>	<b>Gruppe P</b>
<b>Kryopräservation</b>	+	—
<b>Säure</b>	10%	10%
<b>Spülung</b>	24 h M199	24 h M199
<b>Oberfläche</b>	34,5 cm <sup>2</sup>	36,2 cm <sup>2</sup>
<b>Fibroblasten/Zellzahl</b>	0,9 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	0,6 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>
<b>Adhäsion nach 24 h</b>	99%	90%
<b>Endothelzellen/Zellzahl</b>	0,5 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	0,4 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>
<b>Adhäsion nach 24 h</b>	96%	92%
<b>24 h Fibroblasteninkubation</b>	positiv (+) 65%	positiv (++) 85%
<b>24 h Endothelzellinkubation</b>	positiv (+) 75%	positiv (+) 65%
<b>14 d Endothelzellinkubation</b>	positiv (++) 95%	negativ (-) < 40%

Beim Vergleich der Besiedelung von SKL 17 mit SKL 18 zeigte sich bei beiden nach 24-stündiger Fibroblasteninkubation eine Besiedelung mit Zellen. Die Wandprobe von SKL 18 war mit 85% dichter mit Fibroblasten besiedelt als die von SKL 17 (65%). Der Nachweis von CD90 und Prolyl-4-Hydroxylase (Abb. 22A) war positiv. Jedoch kugelten sich die Zellen bei SKL 18 wie schon bei SKL 15 (Ergebnisse 5.2.2.2.) noch vor der Endothelzellbesiedelung ab (Abb. 22B). Die primäre Anhaftung der Endothelzellen war bei beiden Klappen hingegen ähnlich (75% für SKL 17 und 65% für 18), doch nach 14-tägiger Endothelzellinkubation waren auf der Wandprobe von SKL 18 nur noch verstreut liegende, abgekugelte Zellen zu sehen (Abb. 22C), während die Probe von SKL 17 konfluent mit Endothelzellen besiedelt war (Abb. 22D). Der immunhistochemische Nachweis von Faktor VIII und Kollagen IV war zwar in beiden Fällen positiv, aber bei SKL 18 waren nur vereinzelte Faktor VIII positive Zellen zu sehen und der Nachweis von Kollagen IV hatte nur zu einer schwachen Färbung der oberen Matrix geführt. Laminin war nicht nachweisbar.



**Abb. 22 Endothelialisierung einer kryo- im Vergleich zu einer nicht kryopräservierten SKL:** Nach der Besiedelung mit Fibroblasten konnten diese immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Inkubation mit dem Peroxidasegekoppelten Antikörper gegen Prolyl-4-Hydroxylase färbte die positiven Zellen rot (A, 200x Vergrößerung). Im REM zeigte sich nach 7 Tagen bei SKL 18 eine partielle Ablösung der Fibroblasten (B). 14 Tage nach der Inkubation mit Endothelzellen lösten sich diese ebenfalls (C). Auf der kryopräservierten SKL war die Beschichtung zu diesem Zeitpunkt stabil (D).

### **5.3. Endothelialisierung kommerzieller glutaraldehydfixierter Bioprothesen**

Bei den folgenden Versuchen wurden Patches, die aus zwei Aortenbioprothesen gewonnen wurden, endothelialisiert. Außerdem wurden sechs komplette klappentragende Miniroots und fünf gestentete Bioprothesen (Material 2.7.2. und 2.7.3.) mit Zellen beschichtet.

#### **5.3.1. Untersuchungen von Patches aus Freestyle® Prothesen**

##### **5.3.1.1. Endothelialisierung säurebehandelter Patches mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung**

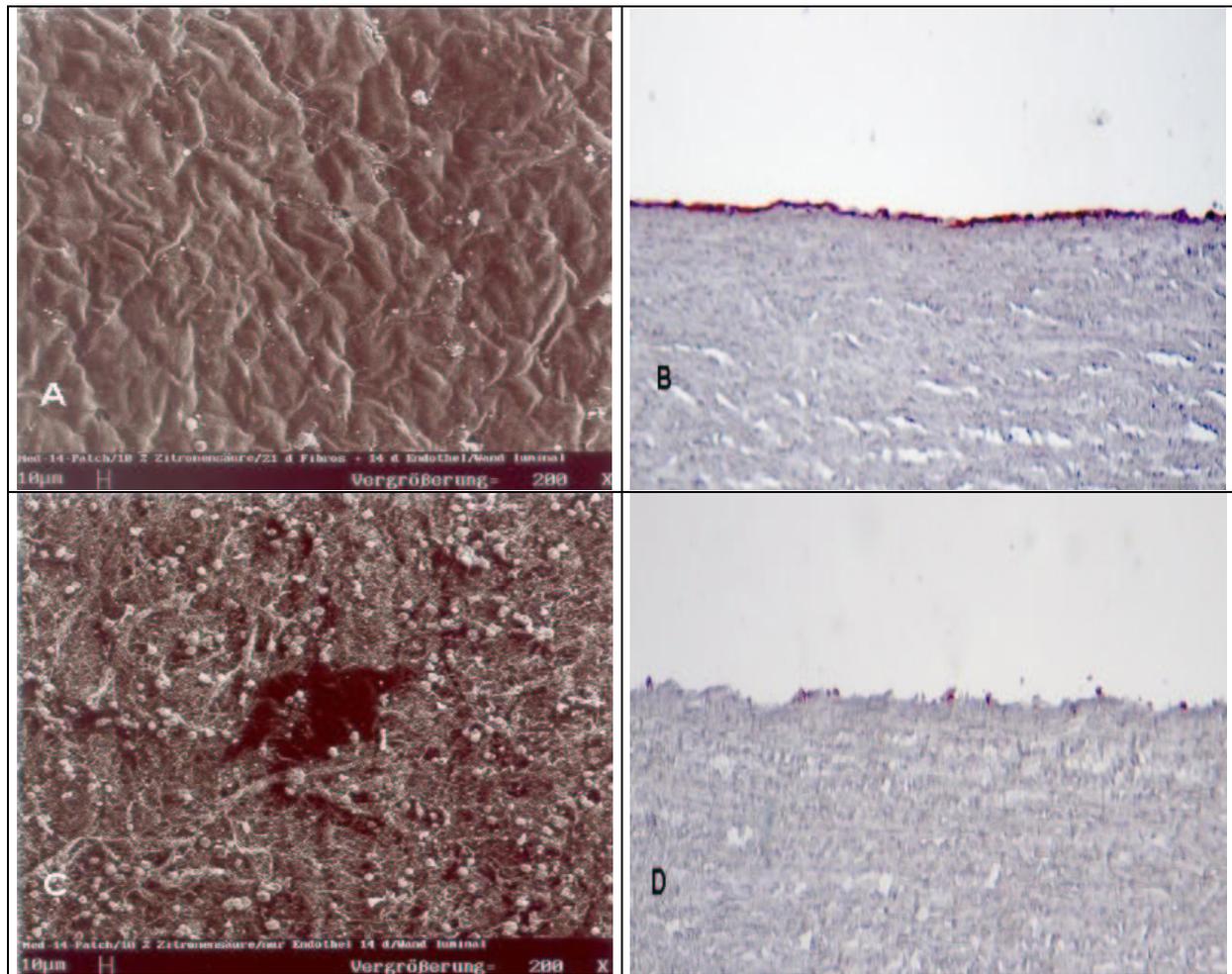
Auf Grund der vorangegangenen Beschichtungsergebnisse wurden Patches der Gruppen H und O (Methoden 3.3.2.) miteinander verglichen (Endothelialisierungsversuche 4.3.1.1.), um zu überprüfen, ob auch bei kommerziell erhältlichem porcinen Material eine stabile Endothelialisierung nach Säurebehandlung möglich und eine Vorbeschichtung mit Fibroblasten dabei von Vorteil wäre. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tab. 12: Endothelialisierung von säurebehandelten Freestyle®-Patches mit und ohne Fibroblastenvorbeschichtung

	<b>Gruppe H</b> (n = 4)	<b>Gruppe O</b> (n = 4)
<b>Säure</b>	10%	10%
<b>Spülung</b>	24 h M199	24 h M199
<b>Fibroblasten/Zellzahl</b>	—	$1,0 \pm 0,1 \times 10^6/\text{cm}^2$
<b>Endothelzellen/Zellzahl</b>	$1,0 \pm 0,2 \times 10^6/\text{cm}^2$	$1,0 \pm 0,2 \times 10^6/\text{cm}^2$
<b>24 h Endothelzellinkubation</b>	positiv (+) 60%	positiv (++) 85%
<b>7 d Endothelzellinkubation</b>	positiv (+) 65%	positiv (++) > 95%
<b>14 d Endothelzellinkubation</b>	negativ (-) < 30%	positiv (++) > 95%

Bei beiden Gruppen war nach 24-stündiger Endothelzellinkubation eine Besiedlung mit ausgespreizten Zellen zu sehen. Morphologisch zeigten diese Zellen das für Endothelzellen typische Pflastersteinmuster. Nach 7 Tagen waren die Zellen auf den Patches der Gruppe O zu einem konfluenten Zellrasen zusammengewachsen. Auch auf der 14-Tage-Probe (Abb. 23A), war eine lückenlose Beschichtung zu sehen. Der immunhistochemische Nachweis (Methoden 3.6.) für CD 31 und Faktor VIII zeigte eine konfluente Beschichtung vitaler Zellen. Ebenso war die Laminin- und Kollagen IV-Färbung (Abb. 23B) zu diesem Zeitpunkt positiv. In Gruppe H

zeigten sich nach 7 Tagen neben ausgespreizten auch sphäroide Zellen. Nach weiteren 7 Tagen hatte sich ein Großteil der Zellen abgekugelt (Abb. 23C) und nur noch insgesamt 25% der untersuchten Probenoberfläche war mit kleinen konfluenten Zellinseln bedeckt, die v.a. im Randbereich der Proben lagen. Der immunhistochemische Nachweis für CD31 (Abb. 23D), Faktor VIII und Kollagen IV bestätigte eine partielle Besiedelung mit vitalen Endothelzellen. Laminin war nicht nachweisbar.



**Abb. 23** Endothelialisierung von säurebehandelten Patches mit und ohne Fibroblasten: 14 Tage nach der Endothelzellinkubation zeigte die REM Aufnahme des vorbeschichteten Patches eine deutlich bessere Zellbesiedelung (A) als der Patch ohne Fibroblasten (C). Die Zellen sind in beiden Fällen vital, was unter anderem durch den Nachweis von Kollagen IV (B) und CD31 (D) nachgewiesen wurde.

### 5.3.1.2. Vergleich der Endothelialisierung zitronen- bzw. ascorbinsäurebehandelter

#### Patches

In diesem Versuch wurde die Besiedelung von Bioprothesen-Patches der Gruppen N und O (Methoden 3.3.2.) miteinander verglichen (Endothelialisierungsversuche 4.3.1.2.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: Vergleich der Endothelialisierung mit Fibroblastenvorbeschichtung nach der Verwendung von Ascorbin- bzw. Zitronensäure

	<b>Gruppe N</b> (n = 4)	<b>Gruppe O</b> (n = 4)
<b>Säure</b>	Ascorbinsäure (10%)	Zitronensäure (10%)
<b>Spülung</b>	24 h M199	24 h M199
<b>Fibroblasten/Zellzahl</b>	$0,4 \pm 0 \times 10^6/\text{cm}^2$	$0,4 \pm 0 \times 10^6/\text{cm}^2$
<b>Endothelzellen/Zellzahl</b>	$1,0 \pm 0,2 \times 10^6/\text{cm}^2$	$1,0 \pm 0,2 \times 10^6/\text{cm}^2$
<b>7 d Endothelzellinkubation</b>	positiv (+) 75% $\pm$ 10,8	positiv (+) 77,5% $\pm$ 11,9

Bei beiden Gruppen zeigte sich kein nennenswerter Unterschied bei der von Zellen bedeckten Fläche. Sowohl die Patches der Gruppe N als auch die der Gruppe O waren mit einem Zellverband überzogen, der durchschnittlich 75 bzw. 77,5 % der Probe bedeckte, wobei die Endothelzellen (Abb. 24) die für sie typische Pflastersteinstruktur aufwiesen. Zellfreie Bereiche lagen v.a. am Rand der Probe.

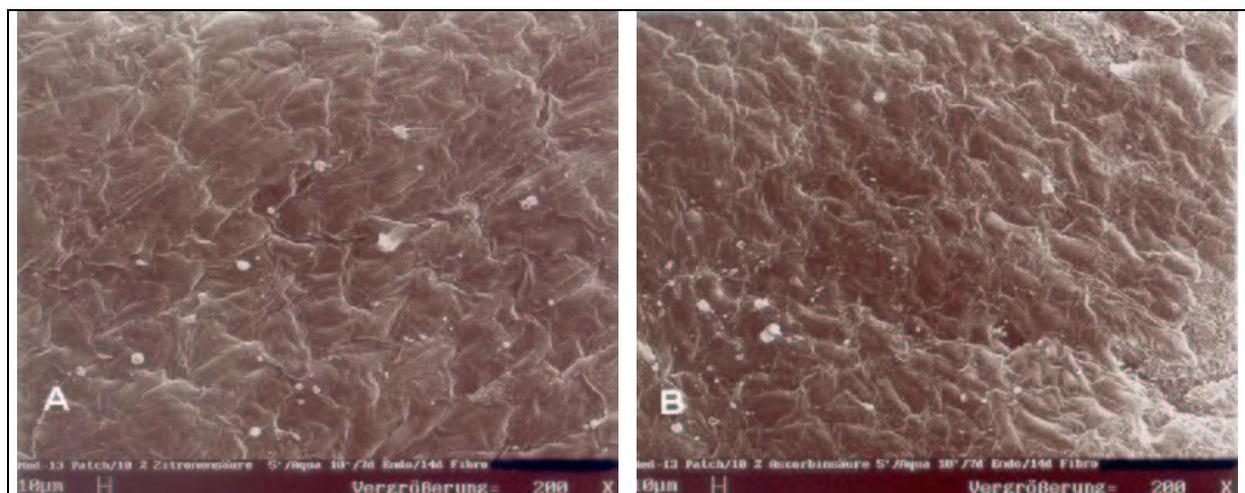


Abb. 24 Endothelialisierte Freestyle® Bioprothesen-Patches nach Inkubation in 10 % AS bzw. ZS: Unabhängig davon, ob AS (A) oder ZS (B) verwendet worden war, war das Lumen der Patches nach 14-tägiger Gesamtinkubation fast konfluent mit morphologisch einwandfreien Zellen bedeckt.

### **5.3.2. Endothelialisierung von Mosaic® Bioprothesen**

Die Mosaic® Bioprothesen wurden untersucht, um zu sehen, ob der Stent, an dem die Segel befestigt waren, einer Zellbesiedelung entgegenwirken würde. Insgesamt standen fünf Bioprothesen zur Verfügung. Diese sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

Tab. 14: Verwendete Mosaic® Bioprothesen

Versuch	Bioprothese	Beschichtung	
		Fibroblasten (Adhäsion)	Endothelzellen (Adhäsion)
4.3.2.1.	Med-5	nein	6,0 x 10 <sup>7</sup> (45%)
	Med-6	1,8 x 10 <sup>7</sup> (99%)	8,3 x 10 <sup>7</sup> (75%)
4.3.2.2.	Med-1	2,9 x 10 <sup>7</sup> (n.a.)	0,3 x 10 <sup>7</sup> (25%)
	Med-2	1,9 x 10 <sup>7</sup> (n.a.)	8,5 x 10 <sup>7</sup> (68%)
	Med-7	1,0 x 10 <sup>7</sup> (98%)	6,2 x 10 <sup>7</sup> (94%)

Zwar waren die Segel dieser Prothesen sehr gut für die Probenentnahme zugänglich (Beschichtungsversuche 4.1.3.), jedoch galt für die Probenaufbereitung der Segel die gleiche Problematik wie bei den Segeln der SKL oder der Freestyle® Prothesen (Ergebnisse 5.1.2.). Manchmal war nicht zu beurteilen, ob es sich bei zellfreien Bereichen um einen Artefakt oder einen *de facto* nicht besiedelten Bereich handelte. Deshalb konnten die Prozentangaben der Oberflächenbesiedelung bei der Dokumentation der Daten nur ungefähr angegeben werden.

#### **5.3.2.1. Endothelialisierung von Mosaic® Bioprothesen mit bzw. ohne Fibroblastenvorbeschichtung**

Nachdem im Laufe dieser Arbeit hinreichend bestätigt worden war, dass eine 24-stündige Spülung von GA-fixiertem Material in M199 für eine primäre Zelladhäsion nötig ist, wurde bei den Mosaic® Bioprothesen auf die anderen Spülungen verzichtet und nur überprüft, ob das Spülschema mit M199 für die Bioprothesen mit Stent ausreichend war. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob eine Fibroblastenvorbeschichtung die Stabilität einer nachfolgenden Endothelialisierung verbesserte. Interessant war, ob die Vorbesiedelung ohne eine Säurebehandlung bereits zu einer dauerhaften Anhaftung der Endothelzellen führen würde. Um dies zu untersuchen, wurde die Endothelialisierung von je einer Bioprothese aus den Gruppen F und M (Methoden 3.3.2.) miteinander verglichen (Endothelialisierungsversuche 4.3.2.1.). Die Beschichtungsergebnisse der entnommenen Segelproben sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Endothelialisierung von Mosaic® Bioprothesen mit bzw. ohne Fibroblastenvorbeschichtung

	<b>Gruppe F</b>		<b>Gruppe M</b>	
<b>Säure</b>	—		—	
<b>Spülung</b>	24 h M199		24 h M199	
<b>Oberfläche</b>	18,2 cm <sup>2</sup>		13,2 cm <sup>2</sup>	
<b>Fibroblasten</b>	—		1,4 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	
<b>Adhäsion nach 24 h</b>	—		98%	
<b>Endothelzellen</b>	3,3 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>		6,3 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	
<b>Adhäsion nach 24 h</b>	45%		75%	
<b>Segelseite</b>	ventrikulär	aortal	ventrikulär	aortal
<b>8 d Fibroblasteninkubation</b>	—	—	positiv (++) 90%	positiv (+) 60%
<b>24h Endothelzellinkubation</b>	negativ (-) 10%	positiv (++) 80%	positiv (+) 60%	positiv (+) 60%
<b>&gt;= 13 d Endothelzellinkubation</b>	negativ (-) 30%	negativ (--)	positiv (++) 80%	positiv (+) 70%
<b>&gt;= 21 d Endothelzellinkubation</b>	negativ (--).	negativ (--)	positiv (+) 40%	positiv (+) 40%

Auf dem untersuchten Segel von Med-6 (Gruppe F) zeigten sich nach 24 h aortal Zellen (Abb. 25A), die ca. 80% der Probenfläche besiedelten. Jedoch war nur ein geringer Teil der Zellen ausgespreizt. Im Inkubationsüberstand hatten sich 55% der primär aufgetragenen Zellen wieder gefunden. Ventrikulär war nur ca. 10% der Fläche von Zellen bedeckt. Nach 14 Tagen war ca. 30% der ventrikulären Segelseite mit z.T. ausgespreizten Zellen besiedelt (Abb. 25B), aber die aortale Seite war zellfrei. Die Klappe wurde daraufhin weiter inkubiert und nach 32 Tagen das restliche Segelmaterial untersucht. Wie zu erwarten war, waren aortal und ventrikulär keine anhaftenden Zellen zu finden. Das Faktor VIII Antigen konnte nach 24-stündiger Endothelzellinkubation nachgewiesen werden. Alle anderen Färbungen waren zu diesem Zeitpunkt und später negativ.

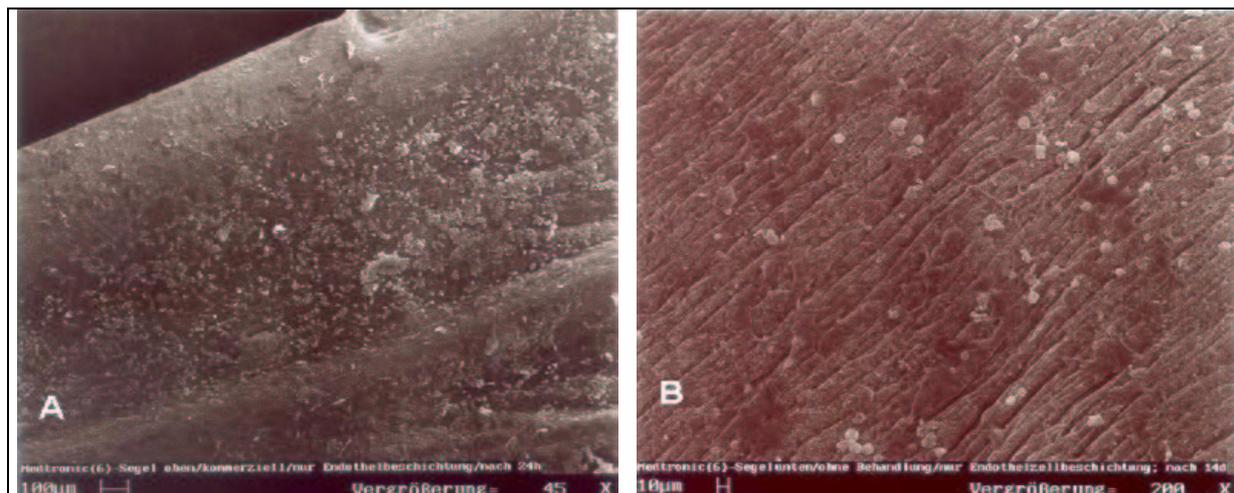
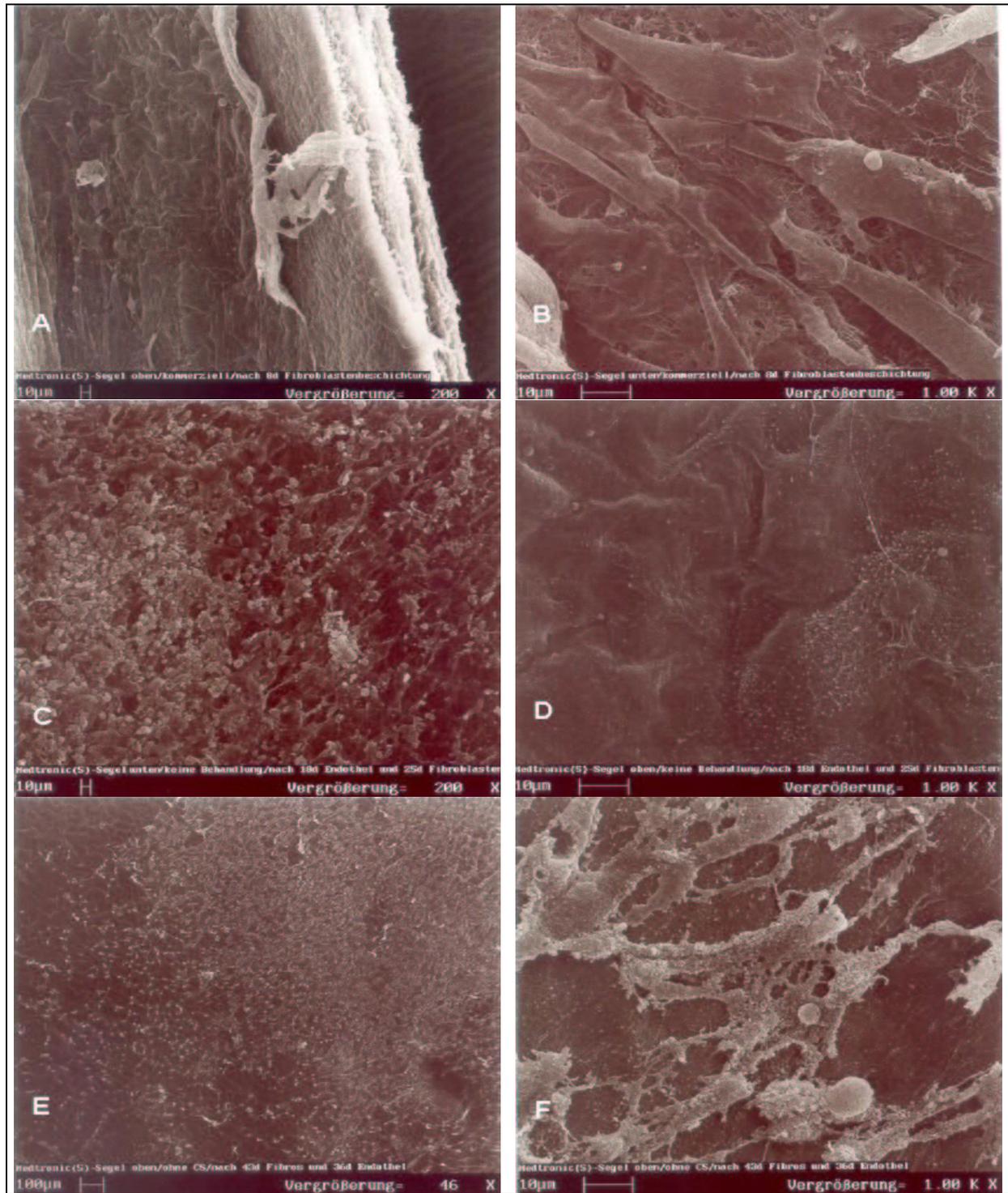


Abb. 25 Endothelialisierte Mosaic® Bioprothesen ohne Fibroblastenvorbeschichtung: Nach anfänglicher Adhärenz (A, Vergrößerung 45x) waren am REM nach 14-tägiger Inkubation nur noch wenige Zellen (B) zu detektieren.

Bei Med-5 (Gruppe M) zeigte bereits die Messung der Lebendzellzahl aus dem Inkubationsüberstand, dass 98% der Zellen adhärenz waren. Die Besiedelung der Segel mit Fibroblasten war aortal nach 8 Tagen fast konfluent, was besonders gut im Randbereich der Probe (Abb. 26A) zu sehen war, an dem der Zellrasen durch die Probenaufbereitung etwas von der porcinen Matrix abgehoben war. Auf der ventrikulären Seite des Segels waren noch einzelne Fibroblasten voneinander zu unterscheiden (Abb. 26B), da hier die Besiedelung mit ca. 60% nicht so dicht war. Bei der Zellzählung nach 24-stündiger Endothelzellinkubation waren 75% der vitalen Zellen adhärenz. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zeigte Endothelzellen, welche die Fibroblasten überlagerten und zusammen mit diesen ca. 60 % der Oberfläche z.T. noch unausgespreizt bedeckten. Die nächste Probe wurde 18 Tage nach der Endothelzellinkubation entnommen und hier zeigten sich deutliche Ablösungserscheinungen auf beiden Seiten der Segel. Trotzdem waren noch ca. 70% der aortalen und ca. 80% der ventrikulären Seite (Abb. 26C) der Probe mit Zellen bedeckt. Diese waren auf der aortalen Seite morphologisch unauffällig (Abb. 26D). Nach 36-tägiger Endothelzellinkubation (Abb. 26E) war noch ca. 40% der Segeloberfläche besiedelt. Allerdings fanden sich neben ausgespreizten Zellen auch viele Zellschatten (Abb. 26F). Der Nachweis von Faktor VIII Antigen und CD31 war bei der Probe, die 13 (14) Tage nach der Endothelzellinkubation untersucht wurde deutlich positiv, zeigte jedoch nach weiteren 7 Tagen v.a. verstreut liegende gefärbte Zellen. CD90 konnte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls anhand einzelner gefärbter Zellen nachgewiesen werden. Die Inkubation mit AK gegen Kollagen IV bzw. Laminin führte zu einer schwachen Peroxidasereaktion.



**Abb. 26 Endothelialisierte Mosaic® Bioprothesen mit Fibroblastenvorbeschichtung:** Adhärierende Fibroblasten auf der aortalen (A) und ventrikulären (B) Segelseite. Am 25. Tag der Gesamtkubation zeigte sich eine teilweise Ablösung der Endothelzellen (C). Die noch anhaftenden Zellen waren zu diesem Zeitpunkt morphologisch unauffällig (D). Nach 43 Tagen waren einige Zellen, die das Segel aortal bedeckten (E), zu Zellschatten geworden (F). Der Vergrößerungsfaktor ist in der jeweiligen Abbildung angegeben.

### 5.3.2.2. Endothelialisierung zitronensäurebehandelter Mosaic® Bioprothesen nach

#### Fibroblastenvorbeschichtung

Die bei der Untersuchung von drei Mosaic® Bioprothesen (Med-1, -2 und -7) der Gruppe O (Endothelialisierungsversuche 4.3.2.2.) erfassten REM-Daten wurden in Tabelle 16 zusammengestellt.

Tab. 16: Endothelialisierung von säurebehandelten Mosaic® Bioprothesen nach Fibroblastenvorbeschichtung

	Gruppe O					
Prothese	Med-1		Med-2		Med-7	
Säure	10%		10%		10%	
Spülung	24 h M199		24 h M199		24 h M199	
Oberfläche	18,2 cm <sup>2</sup>		18,2 cm <sup>2</sup>		19,5 cm <sup>2</sup>	
Fibroblasten	1,6 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>		1,0 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>		0,5 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	
Adhäsion nach 24 h	n.a.		n.a.		98%	
Endothelzellen	0,3 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>		4,7 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>		3,2 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	
Adhäsion nach 24 h	25%		68%		94%	
Segelseite	ventrikulär	aortal	ventrikulär	aortal	ventrikulär	aortal
24 h Endothelzell-inkubation	positiv (+) 70% (Fibroblasten)	positiv (++) 85% (Fibroblasten)	positiv (++) 85%	positiv (++) 85%	positiv (++) 90%	positiv (++) 90%
14 d Endothelzell-inkubation	positiv (++) 95% (Fibroblasten)	positiv (++) 95% (Fibroblasten)	positiv (++) 95%	positiv (++) 90%	positiv (++) 95%	positiv (++) 80%
21 d Endothelzell-inkubation	positiv (++) 95% (Fibroblasten)	positiv (++) 95% (Fibroblasten)	positiv (++) 95%	positiv (++) 95%	positiv (++) 95%	positiv (+) 50%

Med-1 wurde nur mit  $0,3 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> Endothelzellen beschichtet. Dies lag daran, dass die Kultur nach der letzten Passagierung vor der Ernte nicht mehr konfluent geworden war. Die Überprüfung des Überstands nach der Endothelzellinkubation zeigte, dass die Zellen vital aber zu 75% nicht adhärent waren. Im Gegensatz dazu hafteten 68 bzw. 72% der Endothelzellen, die auf Med-2 bzw. Med-7 aufgebracht wurden, an. Die Endothelzellen waren auf Med-1 weder zu diesem Zeitpunkt noch später, am REM zu sehen. Ebenso waren immunhistochemische

Färbungen für Faktor VIII und CD31 negativ. Med-1 wurde trotzdem weiter inkubiert und untersucht, denn diese Klappe bot die Gelegenheit, eine Langzeitbeobachtung der Fibroblastenbesiedelung durchzuführen. Nach 21- und 28-tägiger Inkubation (Abb. 27A und B) waren beide Segelseiten konfluent mit Fibroblasten besiedelt, was am 21. Tag durch Färbung mit CD90 AK (Abb. 27C) bestätigt wurde. Außerdem zeigten die Zellen eine für sie typische spindelförmige Morphologie.

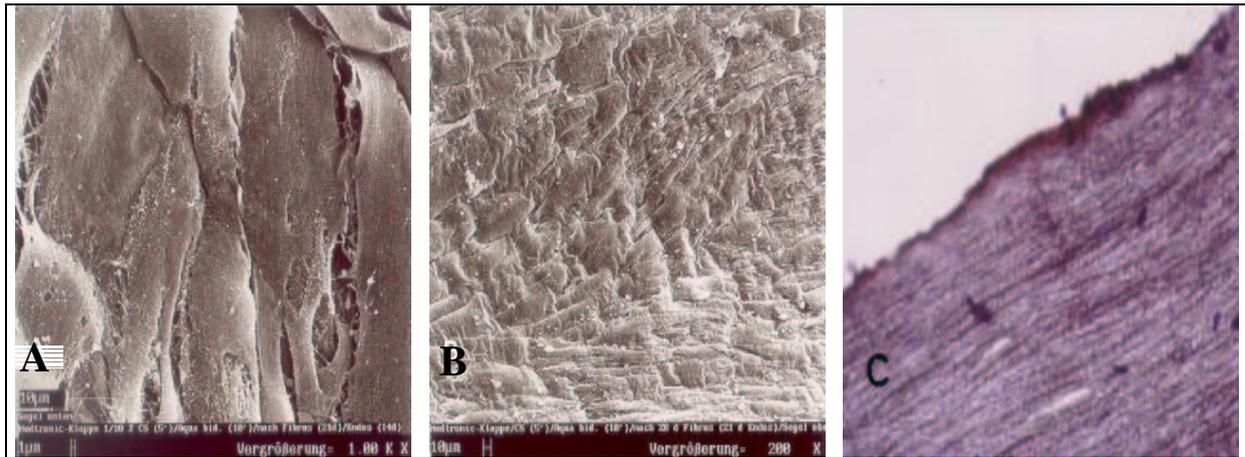


Abb. 27 Fibroblastenbesiedelung einer säurebehandelten Mosaic<sup>®</sup> Bioprothese: Die ventrikuläre (A, 1000x Vergrößerung) und die aortale (B) Segelseite waren nach 21- bzw. 28-tägiger Inkubation dicht mit Fibroblasten besiedelt. Die Expression von CD90 (C) zeigte sich durch eine starke Rotfärbung der Zellen.

Bei Med-2 und Med-7 zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation mit Endothelzellen eine beinahe konfluente Besiedelung mit ca. 85% bzw. 90% bedeckter Fläche. Nach 14 und 21 Tagen (Abb. 28A) war die Ventrikularis beider Klappen lückenlos besiedelt. Die aortale Seite der Segel war nur bei Med-2 fast konfluent, während sich bei Med-7 die Zellen z.T. (ca. 50%) abgekugelt hatten (Abb. 28B). Der Nachweis für CD31, Faktor VIII (Abb. 28C) und Kollagen IV (Abb. 28D) war nach der Gesamtinkubationszeit von 28 Tagen ebenso wie der Nachweis für CD90 und Laminin positiv.

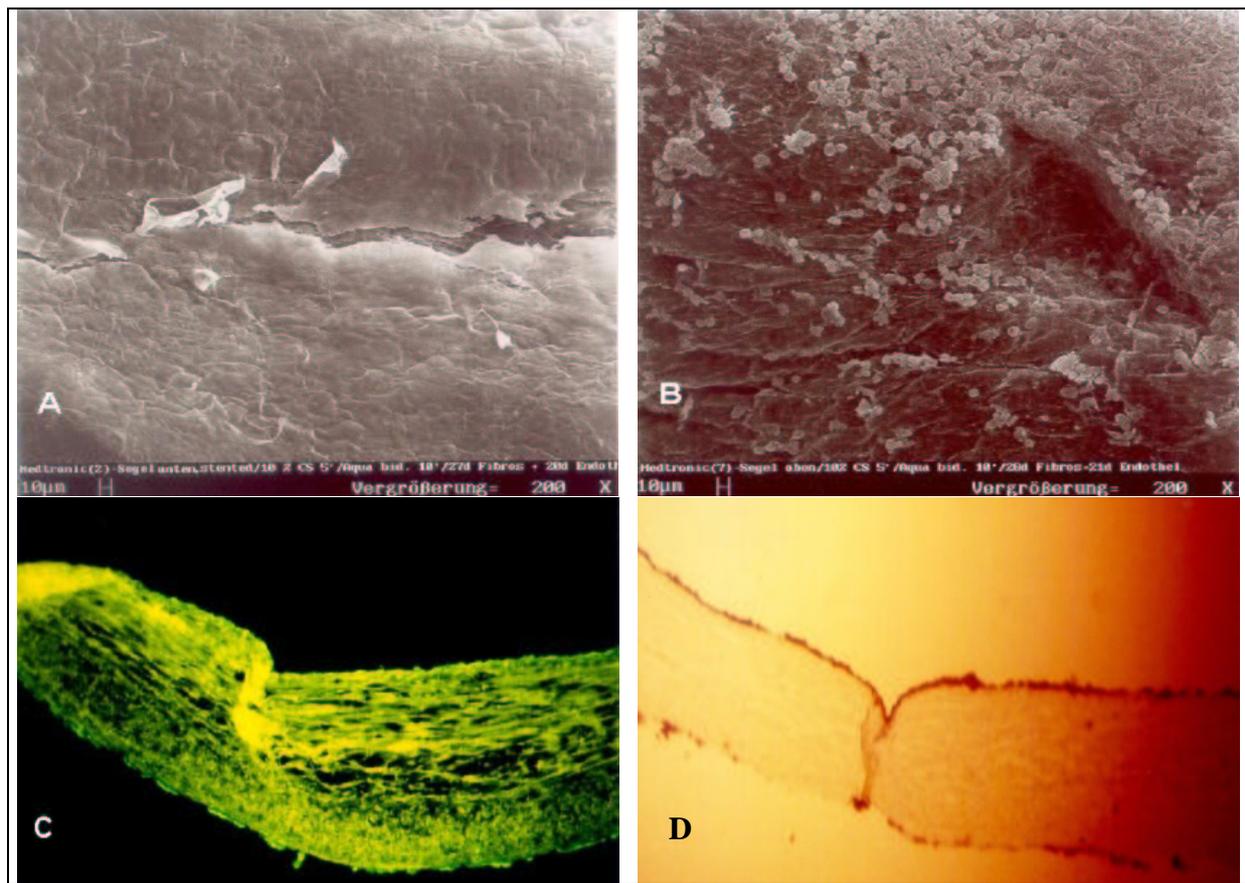


Abb. 28 Endothelialisierung säurebehandelter Mosaic<sup>®</sup> Bioprothesen nach Fibroblastenvorbeschichtung: Der Endothelzellrasen war nach 20 Tagen auf der Ventrikularis konfluent (A), doch es kam zur Abkuglung auf der aortalen Seite (B). Die Vitalität der Zellen wurde durch den Nachweis von Faktor VIII Antigen bestätigt (C, helle fluoreszierende Linie) und ebenso wurde zu diesem Zeitpunkt Kollagen IV von den Zellen exprimiert, was an der deutlichen Rotfärbung der Zellen auf beiden Seiten des Segels zu erkennen war (D).

### 5.3.3. Endothelialisierung von Freestyle<sup>®</sup> Bioprothesen

Für die Endothelialisierung von klappentragenden Miniroot-Prothesen wurden 6 Freestyle<sup>®</sup> Bioprothesen verwendet. Eine Übersicht ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 17.: Verwendete Freestyle<sup>®</sup> Bioprothesen

Versuch	Bioprothese	Beschichtung	
		Fibroblasten (Adhäsion)	Endothelzellen (Adhäsion)
4.3.3.	Med-3	1,9 x 10 <sup>7</sup> (94%)	11,0 x 10 <sup>7</sup> (96%)
	Med-4	2,8 x 10 <sup>7</sup> (n.a.)	2,2 x 10 <sup>7</sup> (n.a.)
	Med-9	2,9 x 10 <sup>7</sup> (99%)	1,5 x 10 <sup>7</sup> (87%)
	Med-10	2,6 x 10 <sup>7</sup> (92%)	1,3 x 10 <sup>7</sup> (86%)
	Med-11	2,4 x 10 <sup>7</sup> (84%)	1,3 x 10 <sup>7</sup> (79%)
	Med-12	7,3 x 10 <sup>7</sup> (74%)	8,8 x 10 <sup>7</sup> (81%)

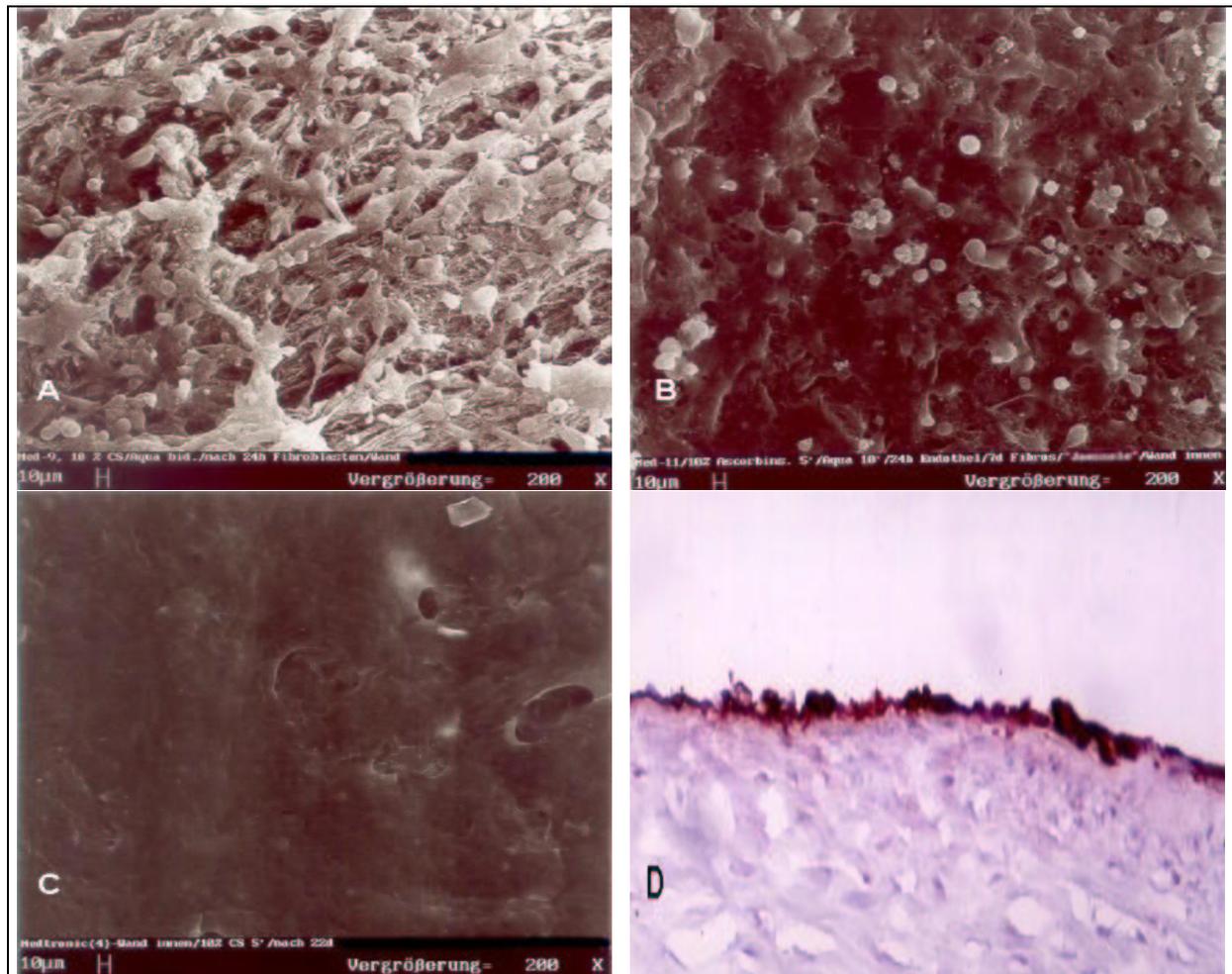
Die primäre Adhäsion der Zellen, die aus der Vitalfärbung (Methoden 3.1.4.) des Inkubationsüberstandes ermittelt wurde, betrug  $88,3 \pm 8,8\%$  für die Fibroblasten bzw.  $85,7 \pm 5,9\%$  für die autologen Endothelzellen. Die 6 Bioprothesen wurden dem Behandlungsschema der Gruppe O (Methoden 3.3.2.) unterzogen. Die erfassten Daten (Endothelialisierungsversuche 4.3.3.) sind in Tabelle 18 zusammengestellt.

Tab. 18: Endothelialisierung von säurebehandelten Freestyle® Bioprothesen nach Fibroblastenvorbeschichtung

	<b>Gruppe O</b>					
<b>Prothese</b>	Med-3	Med-4	Med-9	Med-10	Med-11	Med-12
<b>Säure</b>	10%	10%	10%	10%	10%	10%
<b>Spülung</b>	24 h M199					
<b>Oberfläche</b>	36,2 cm <sup>2</sup>	33,0 cm <sup>2</sup>	29,8 cm <sup>2</sup>	42,4 cm <sup>2</sup>	36,2 cm <sup>2</sup>	33,0 cm <sup>2</sup>
<b>Fibroblasten</b>	0,5 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	0,9 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	0,6 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	0,7 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	2,2 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>
<b>Adhäsion nach 24 h</b>	94%	n.a.	99%	92%	84%	74%
<b>Endothelzellen</b>	3,0 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	0,7 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	0,5 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	0,3 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	0,4 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>	2,7 x 10 <sup>6</sup> /cm <sup>2</sup>
<b>Adhäsion nach 24 h</b>	96%	n.a.	87%	86%	79%	81%
<b>24 h Fibroblasten inkubation</b>	positiv (+) 65%	positiv (++) 80%	positiv (+) 70%	positiv (++) 85%	positiv (++) 85%	positiv (++) 80%
<b>24 h Endothelzell-inkubation</b>	positiv (++) 95%	positiv (++) 95%	positiv (++) 80%	negativ (-) 30%	positiv (+) 85%	positiv (++) 80%
<b>14 d Endothelzell-inkubation</b>	positiv (++) 95%	positiv (++) 95%	positiv (++) 95%	negativ (-) 20%	positiv (++) 95%	positiv (++) 80%
<b>21 d Endothelzell-inkubation</b>	positiv (++) 95%	positiv (++) 95%	positiv (++) 95%	nicht verfolgt	positiv (++) 95%	positiv (++) 95%

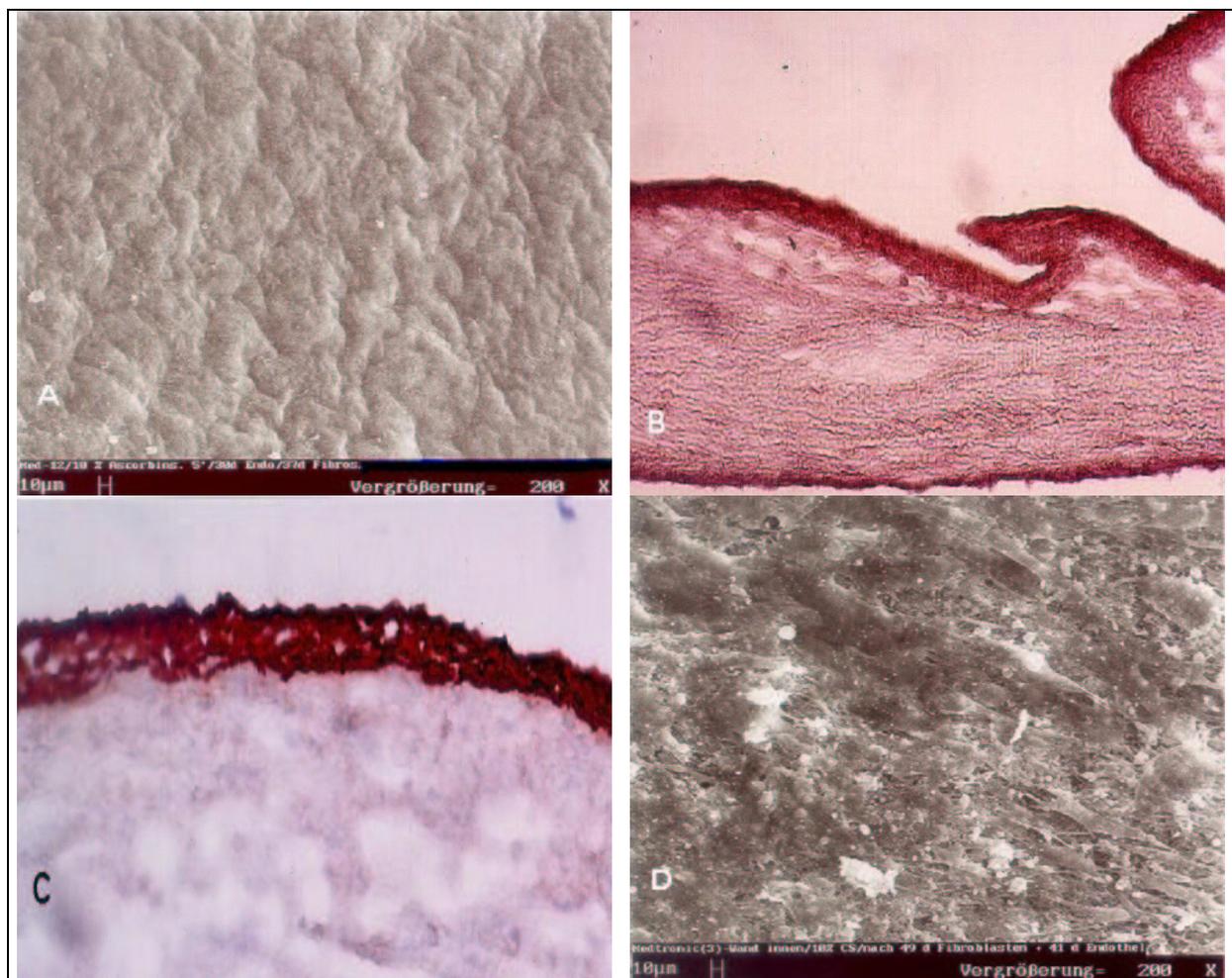
Die Proben aller Klappen zeigten nach 24-stündiger Fibroblasten- bzw. Endothelzellinkubation (Abb. 29A und B) am REM eine Zellbesiedelung von  $78 \pm 8,2$  bzw.  $\pm 24,2\%$ . Der Nachweis von Prolyl-4-Hydroxylase bzw. CD90 war vor der Inkubation mit Endothelzellen bei allen Klappen positiv. 21 Tage nach dem Auftragen der Endothelzellen waren bei Med-10 keine positiv gefärbten Zellen mehr zu sehen. Auf dieser Klappe konnte zu diesem Zeitpunkt noch

Faktor VIII Antigen und CD31 partiell nachgewiesen werden. Segelproben wurden ab Tag 14 nach der Endothelzellinkubation fixiert und untersucht. Bis auf Med-10 waren alle untersuchten Klappen am 21. bzw. 22. Tag der Endothelzellinkubation konfluent besiedelt, die 95% der Fläche bedeckten. Sowohl die Wand- als auch die Segelproben zeigten im REM einen lückenlosen, polygonalen Monolayer (Abb. 29C). Die positive Färbung von CD31 (Abb. 29D), Faktor VIII Antigen, Laminin und Kollagen IV zeigte die Vitalität dieser Zellen.



**Abb. 29 Endothelialisierung säurebehandelter Freestyle® Bioprothesen nach Fibroblastenvorbeschichtung:** Die Besiedlung nach jeweils 24-stündiger Inkubation mit Fibroblasten (A) und Endothelzellen (B), war im REM deutlich zu sehen. 22 Tage nach der Inkubation mit Endothelzellen war die Lumenwand konfluent mit Zellen bedeckt (C). Der Nachweis mit peroxidasegekoppeltem Anti-CD31 AK war durch die Rotfärbung der Zellen (D, Vergrößerung 200 x) zu erkennen.

Die Beschichtung der Klappen Med-4, -9 und -11 wurde nicht weiter verfolgt, aber bei Med-3 und -12 wurde die Stabilität der Beschichtung länger beobachtet. Med-12 zeigte nach 30-tägiger Endothelzellinkubation (37 Tage Gesamtkubation) einen konfluenten Zellrasen auf dem Gefäßlumen (Abb. 30A) und beiden Segelseiten. Die Faktor VIII-Färbung war positiv (Abb. 30B). Die Segelprobe von Med-3 war noch am 48. Tag nach Gesamtkubation auf beiden Seiten konfluent mit vitalen Zellen besiedelt, was durch die positive Färbung von Faktor VIII und Kollagen IV (Abb. 30C) nachgewiesen wurde. Auf dem Lumen zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine Auflockerung des Zellteppichs und es waren einzelne Zellen zu erkennen, bei denen es sich auf Grund ihrer Spindelform (Abb. 30D) um Fibroblasten handelte, was durch eine positive Färbung mit CD90 AK bestätigt wurde.



**Abb. 30 Endothelialisierte und fibroblastenvorbeschichtete Freestyle® Bioprothesen:** Nach 37-tägiger Inkubation war der Endothelzellrasen auf der REM Probe des Gefäßlumens konfluent besiedelt (A). Die Expression von Faktor VIII ließ sich zu diesem Zeitpunkt durch eine Peroxidasefärbung eindeutig auf beiden Segelseiten (B) nachweisen. Nach 49 Tagen erkannte man deutlich, dass Kollagen IV im gesamten Bereich zwischen den Endothelzellen und der porcinen Matrix präsent war (C, Vergrößerung 400 x), wobei man am REM Bereiche erkannte, in denen ein Teil der Endothelzellen abgelöst war und spindelförmige Fibroblasten zu sehen waren.

Bereits 7 Tage nach Fibroblastenbesiedelung von Med-10 waren die Zellen zum Großteil abgekugelt. Nach der Inkubation mit den autologen Endothelzellen sah man kleine Zellinseln, die ca. 30% der untersuchten Aortenwandprobe bedeckten (Abb. 31A). 14 Tage später waren nur noch verklumpte Zellagglomerate zu finden (Abb. 31B).

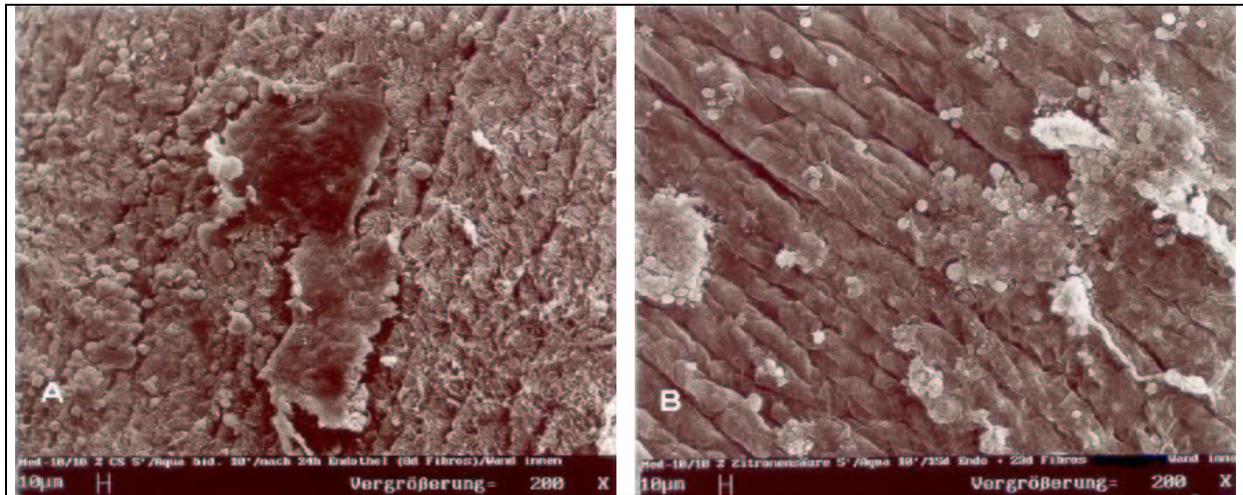


Abb. 31 Endothelialisierung Freestyle® Bioprothesen Med-10: Bereits nach 24-stündiger Endothelzellinkubation waren am REM nur wenige Zellen ausgespreizt (A). 14 Tage später waren nur noch Zellagglomerate (B) zu sehen.

Die zellfreie Präparation der Freestyle® Bioprothesen schien dazu zu führen, dass bei drei der untersuchten Klappen (Med-3, -4 und -11) auch die Außenseite der Gefäßwand mit humanen Zellen besiedelt wurde. Der Zellteppich war am 21. Tag der Gesamtinkubation konfluent (Abb. 32A), was im Vergleich mit der unbeschichteten Probe (Abb. 32B) deutlich zu erkennen war. Med-3 zeigte noch am 49. Tag eine partielle Besiedelung. Der Nachweis für Faktor VIII Antigen und CD31 bestätigte, dass es sich um humane Zellen handelte.

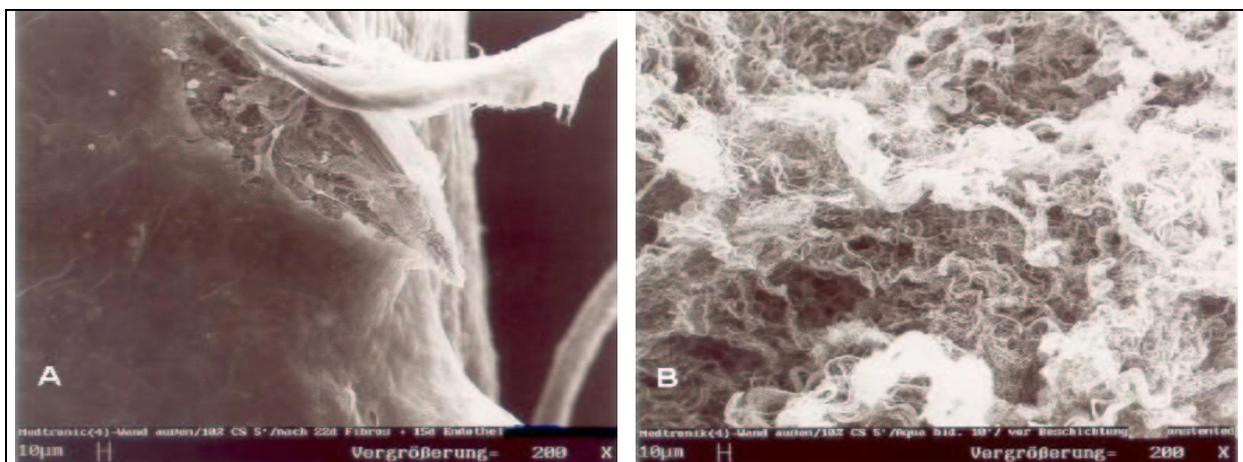


Abb. 32 Endothelialisierung der Außenwand von Freestyle® Bioprothesen: Die Zellbesiedelung mit polygonalen Zellen war deutlich zu erkennen (A). Eine Stelle, an welcher der Zellrasen aufgerissen war (Pfeil), zeigte die faserige Struktur des Kollagengerüsts, die wie die unbeschichtete Kontrolle (B) aussah.

# DISKUSSION

## 6. Diskussion

### 6.1. Zielsetzung und Beweisführung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, GA-fixierte porcine Herzklappen mit humanen Endothelzellen zu besiedeln. So sollten die guten hämodynamischen Eigenschaften von biologischen Prothesen (*Magilligan et al., 1983; David et al., 1990; Bernal et al., 1991; Fischlein et al., 1994; Sidiropoulos et al., 1997*) und ihre niedrige Immunogenität, die auf Grund ihrer Fixierung in GA erreicht wurde (*Schutz et al., 1994; Fischlein et al., 1995*) mit den physiologischen Eigenschaften eines konfluenten Endothelzellteppichs vereint werden. Die Besiedelung sollte unter Kulturbedingungen mindestens 21 Tage konfluent bleiben.

Die diesbezüglichen Versuche anderer Arbeitsgruppen waren bisher wenig erfolgreich. Eine mögliche Fehleinschätzung bei der Betrachtung dieses Problems könnte gewesen sein, dass v.a. die Zytotoxizität des Glutaraldehyds, die in Zellkulturversuchen bestätigt wurde (*Speer et al., 1980; Gendler et al., 1984*), als Grund für die fehlgeschlagene Endothelialisierung vermutet wurde. Die These war, dass Endothelzellen nicht adhärten, weil sie durch das aus der Matrix freigesetzte GA getötet wurden: In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass GA in der Konzentration, die allgemein zur Fixierung von Herzklappen-Bioprothesen eingesetzt wird, zelltoxisch (*Fischlein et al., 1992; Hoffmann et al., 1992; Fischlein und Fasol 1996; Lehner et al., 1997; Fu et al., 1997*) und eine dauerhafte Reendothelialisierung von solchem Material nicht möglich ist (*Eberl et al., 1992; Fischlein et al., 1992; Bengtsson et al., 1993 [1] und [2]; Fischlein et al., 1994; Fischlein und Fasol 1996; Lehner et al., 1997*).

Die These dieser Arbeit beruhte nun auf der Annahme, dass nicht die Toxizität des freigesetzten Glutaraldehyds die dauerhafte Endothelzelladhäsion verhinderte, sondern die herabgesetzte Hydrophilie der vernetzten Kollagenmatrix, die durch das GA herbeigeführt wurde.

Bei der Vernetzung von GA mit den Kollagenfasern der porcinen Matrix entstehen kovalente Bindungen. Dies führt dazu, dass ein Großteil des GA nicht mehr reaktiv und wasserlöslich ist und folglich scheint bereits das Auswaschen der restlichen ungebundenen, toxischen Aldehyde für eine primäre Zelladhäsion auszureichen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Endothelzellen auf Material, das 3 Wochen in PBS gespült worden war, zunächst 2 Tage adhärten und sich erst dann ablösten (*Eberl et al., 1992; Fischlein et al., 1992; Bengtsson et al., 1993*). Die Schlussfolgerung, die dabei gezogen wurde, nämlich dass die Toxizität des Glutaraldehyds für das Ablösen der Zellen verantwortlich war, war zwar naheliegend, aber

keinesfalls zwingend, zumal nicht nachgewiesen wurde, ob die gelösten Zellen wirklich tot waren.

Eine alternative Erklärung dafür, dass Endothelzellen nicht dauerhaft adhärerten, bietet die chemische Veränderung der Oberfläche, die durch die Vernetzung hydrophob wurde: die Reaktion des Glutaraldehyds mit den Aminogruppen der Matrixproteine (*Darnell et al., 1990*) führt über die Bildung von Schiffsbasen (Abb. 33A) oder alternativ über den Reaktionsweg der Aldolkondensation (Abb. 33B) nicht nur dazu, dass das Kollagengerüst einen Teil seiner Antigenität verliert, sondern auch dazu, dass die Oberfläche hydrophob wird (*Richter, 2003*) und somit Zellen schlecht adhäreren können. Die Antimineralisationsverfahren, die bei den heutigen Bioprothesen Verwendung finden (Einleitung 1.4.1.) erniedrigen zwar die Kalzifikation, erhöhen aber durch die Einführung großer aliphatischer Ketten an den Kollagenfasern gleichzeitig noch den hydrophoben Effekt.

Die These dieser Arbeit wurde durch die Endothelialisierung alternativ behandelte Bioprothesen unterstützt: Fotooxidierte Bioprothesen (*Bengtsson et al., 1995*), bei denen die Oxidation des kollagenen Materials die Hydrophilie erhöhte, konnten ebenso erfolgreich endothelialisiert werden wie dezellularisierte und unfixierte Xenografts, deren ursprüngliche hydrophile Eigenschaften nicht verändert worden waren (*Bengtsson et al., 1993; Bader et al., 1998*).

Mehrere Studien zeigten außerdem eine verbesserte Endothelialisierung von Bioprothesen, die über 7 Tage stabil blieb, nachdem das Material vor der Inkubation mit Zellen über einen längeren Zeitraum mit PBS gespült und 48 h in L-Glutaminsäure inkubiert worden war (*Fischlein et al., 1992; Bengtsson et al., 1993 [2]; Fischlein et al., 1994; Bengtsson et al., 1995; Lehner et al., 1996; Zilla et al., 1997*). Der pH-Wert der verwendeten Aminosäurelösung lag dabei bei  $\geq 3,5$ .

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Verwendung einer Lösung einer organischen Säure mit niedrigerem pH-Wert die Hydrophilie der Matrix soweit wieder herstellt, dass eine dauerhafte Zelladhäsion erreicht werden kann: Zitronensäure (2-Hydroxy-1,2,3-propantricarbonsäure,  $C_6H_8O_7$ ) ist eine starke organische Säure und besitzt drei Carboxylgruppen, die mit den Aminogruppen der Kollagenfasern Bindungen eingehen (Abbildung 33C), was zu einer deutlichen Erhöhung der Hydrophilie der Matrixoberfläche führt. Der pH-Wert einer 10%igen, 37 °C warmen Lösung in Aqua bidest liegt bei 1,48.

Parallel wurde Ascorbinsäure (R-5-[(S)-1,2-Dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-5-(H)-furan-2-on,  $C_6H_8O_6$ ) verwendet, da diese bei einer späteren klinischen Anwendung als körpereigenes Vitamin gut zu handhaben wäre.

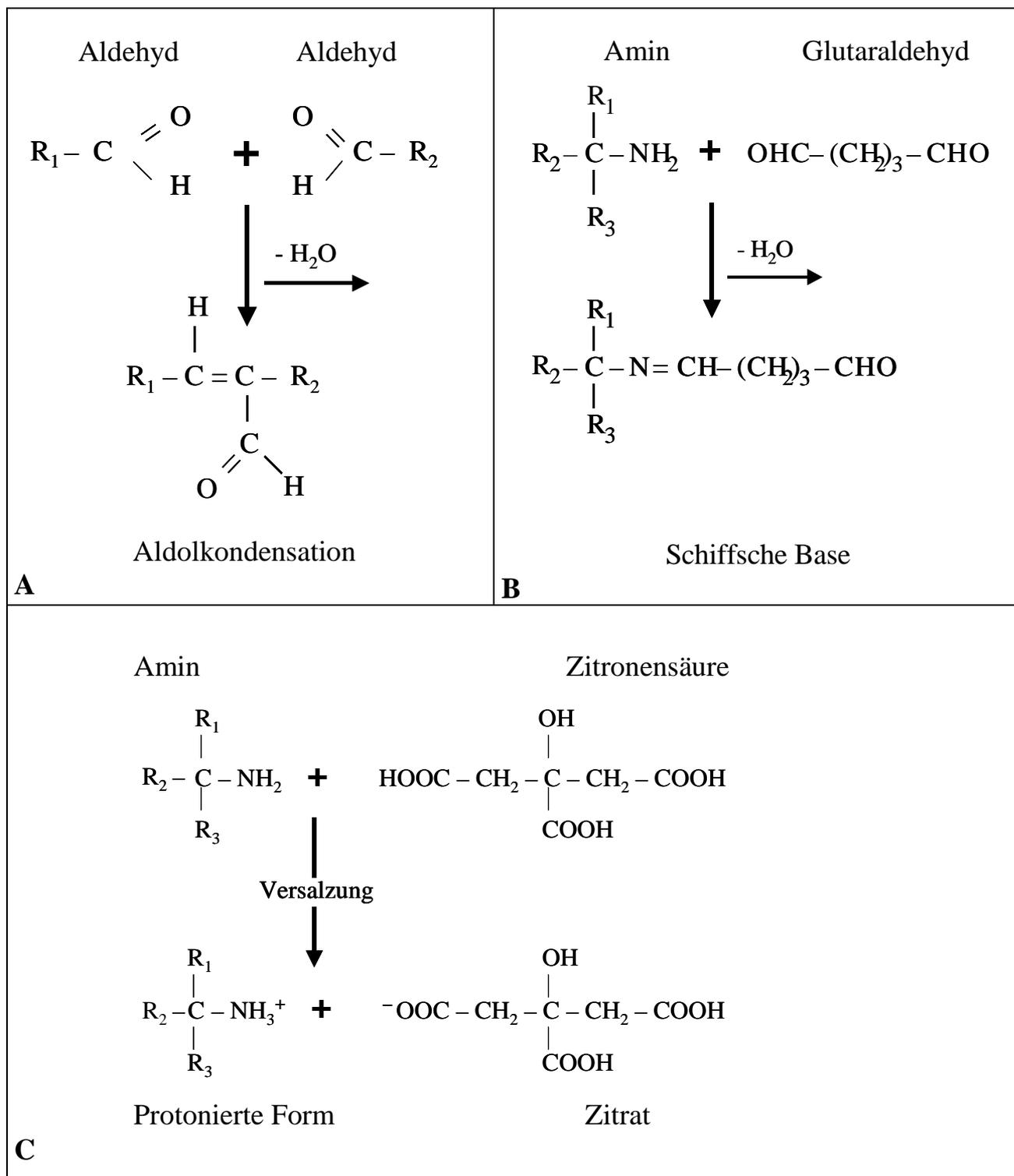


Abb. 33 Chemische Reaktionen: Aldolkondensation durch Hydrolyse zweier Aldehyde (A). Bildung einer Schiffschen Base durch die Reaktion einesamins und Glutaraldehyd (B). Entstehung ionisierter Bindungen durch die Versalzungsreaktion zwischen Zitronensäure und einesamins (C).

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war, die Stabilität der aufgebrauchten Endothelzellen durch die Vorbeschichtung mit autologen Fibroblasten zu erhöhen. Die Arbeitsgruppen, die bisher mit humanen Zellen arbeiteten, benutzten selten vaskuläre Fibroblasten, da ihre Gewinnung

erheblich aufwendiger als die aus Fett- oder Hautgewebe ist. Doch Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft synthetisieren auch Kollagene unterschiedlicher Art (*Darnell et al., 1990*). Deshalb wurden in dieser Arbeit Fibroblasten verwendet, die wie die zugehörigen Endothelzellen aus der *Vena saphena magna* gewonnen wurden.

## **6.2. Eliminierung zelltoxischer Mengen Glutaraldehyds durch geeignete Spülung des porcinen Materials**

Um zu überprüfen, ob toxische Mengen des Fixans durch eine einfache Spülung des porcinen Materials eliminiert werden konnten und somit eine Zelladhäsion zu erreichen, wurden verschiedene Spülungen (Endothelialisierungsversuche 3.3.1.) des fixierten Materials durchgeführt.

Die durchgeführten Toxizitätstests (Ergebnisse 5.2.1.1. und 5.2.1.2.) zeigten, dass aus ungespültem Material offensichtlich genügend ungebundenes GA ins Medium freigesetzt wurde, um sowohl eine Besiedelung als auch ein Überleben der Zellen auf dem Schalenboden zu verhindern, so wie dies bereits mehrfach beschrieben wurde (*Hoffmann et al., 1992; Fischlein et al., 1992; Fischlein et al., 1994; Fu et al al., 1997; Lehner et al., 1997*). Bereits eine 10-minütige Spülung reichte – unabhängig vom verwendeten Medium – aus, damit ein Teil der Zellen überlebte. Die so gespülten Patches gaben nur noch Mengen GA ab, die dazu ausreichten, die Zellen in unmittelbarer Nähe des Materials zu töten. In einiger Entfernung war scheinbar der Verdünnungsfaktor bereits hoch genug, um die Vitalität der Zellen nicht mehr zu beeinträchtigen. Ebenso verhielt es sich nach einer 24-stündigen Spülung des Materials in NaCl bzw. PBS.

Interessanterweise spülte nur M199 vorab ausreichend viel GA aus, um sowohl das Überleben der Zellen als auch deren primäre Adhäsion auf dem porcinen Material zu gewährleisten. Die Versuche zeigten, dass die toxische Menge GA aus dem porcinen Material effektiv durch eine 24-stündige Spülung in M199 entfernt wurde. Die Zellen überlebten die Inkubation mit solchem Material in morphologisch einwandfreiem Zustand. Es musste folglich andere Gründe als die Toxizität des Glutaraldehyds dafür geben, dass die primäre Adhäsion der Zellen nach 24 h verloren ging.

Eine Erklärung dafür, dass M199 im Gegensatz zu physiologischer NaCl und PBS in der Lage war, das GA offensichtlich besser auszuspülen, könnte sein, dass diese Medien unterschiedliche pH-Werte hatten: Bei 37 °C hatte M199 einen pH Wert von 7,9, während der von NaCl bei 7,4 und der von PBS bei 7,5 lag. Eventuell wurde das ungebundene GA im alkalischeren Bereich

besser aus der Matrix gespült. Anzumerken ist hierbei, dass M199 erst bei der Inkubation in einem CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank durch die Reaktion des im Medium enthaltenen Ca<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Lindl, 2001) einen physiologischen pH-Wert von 7,4 erreicht (Methoden 3.3.1.).

Außerdem enthielt M199 Aminosäuren, die während des Spülvorgangs mit dem zitronensäure-behandelten Kollagengerüst des Herzklappenmaterials in Kontakt kamen. Vermutlich kam es dabei zu Bindungen zwischen der ionisierten Matrix (Abb. 33C) und diesen Aminosäuren, was zur Bildung einer neuen, artifiziellen Proteinoberfläche führte, auf der die anschließend aufgebrauchten humanen Zellen dauerhaft adhären konnten.

Die Betrachtung von klappentragenden Miniroots, die eine größere zu beschichtende Fläche aufwiesen, bestätigte die Effektivität der 24-stündigen M199 Spülung (Ergebnisse 5.2.2.1.). Eine 10-minütige Spülung in NaCl reichte nicht aus, um eine partielle Besiedelung mit Endothelzellen zu erreichen, wie sie bei den vergleichbaren Patches zu sehen war. Möglicherweise gab die große Oberfläche insgesamt mehr GA ab. Eine weitere Erklärung wäre, dass die 10% besiedelte Fläche, die auf den untersuchten Patches gefunden wurde, durch die stichpunktartig entnommenen Proben aus der Aortenwand zufällig nicht entdeckt wurde und somit die NaCl-gespülten SKL fälschlicherweise als unbesiedelt beurteilt wurden.

### **6.3. Einfluss einer Säurebehandlung auf die Endothelialisierung**

Nachdem die Spülungsversuche gezeigt hatten, dass die toxische Menge GA eliminiert werden konnte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob durch die Behandlung mit organischer Säure die ursprüngliche Hydrophilie der porcinen Matrix soweit wieder hergestellt werden konnte, um eine dauerhafte Zelladhäsion zu erreichen, da Zellen durch die Ausbildung von Pseudopodien nur an Oberflächen mit hydrophilen Eigenschaften haften können.

Versuche mit GA-fixiertem Material hatten gezeigt, dass solches Gewebe nach einer Behandlung mit verschiedenen Aminosäuren eine verbesserte Zelladhäsion zeigen (Moritz *et al.*, 1990; Eberl *et al.*, 1992; Fischlein *et al.*, 1992; Bengtsson *et al.*, 1993; Fischlein *et al.*, 1994; Fischlein und Fasol, 1996; Fu *et al.*, 1997; Lehner *et al.*, 1997; Zilla *et al.*, 1997), wobei besonders ein saurer pH-Wert den Besiedlungserfolg steigerte (Fischlein *et al.*, 1994).

Die Spülversuche dieser Arbeit (siehe oben) hatten gezeigt, dass die Zellen, die auf dem 24 h mit M199 gespülten Miniroots adhärten, stabil anhafteten. Die Zellen konnten sich jedoch nicht zu einem konfluenten Zellrasen ausbreiten. Möglicherweise hafteten die Zellen nur an den Bereichen an, deren hydrophile Eigenschaften ausreichten, um einen geeigneten Untergrund zur Adhäsion zu bereiten.

Als erstes wurde im Rahmen der Toxizitätstests (5.2.1.1. und 5.2.1.2.) gezeigt, dass eine Behandlung mit 5 oder 10% AS bzw. ZS das Überleben von Endothelzellen, die mit einem solchen Patch inkubiert wurden, nicht beeinträchtigte. Während der Inkubation des Materials wurde offensichtlich keine ungebundene Säure abgegeben, was zu einer Senkung des pH-Wertes des Kulturmediums geführt hätte. Dies hätte wiederum zu einer Beeinträchtigung der Vitalität der Endothelzellen geführt, da diese nur in einem engen pH-Bereich von 7,2 bis 7,4 gut gedeihen können (Lindl, 2001).

Eine Säurekonzentration von 10% erwies sich als optimal. Eine Säurebehandlung des Materials mit einer Konzentration von 15% rief hingegen eine Reaktion des Zellverbandes hervor: Er erschien deutlich aufgelockert. Möglicherweise gab es bei dieser Konzentration einen Überschuss an ungebundener Säure, der ins Kulturmedium ausgewaschen wurde.

Im Gegensatz zum nur gespülten Material wurde nach der Säurebehandlung eine stabile, fast konfluente Endothelialisierung erreicht, bei der sich erst nach 14 Tagen Zellen zu lösen begannen (Ergebnisse 5.2.1.2. und 5.2.1.3.). Nach 21 Tagen waren immer noch Zellen adhärent. Die Behandlung mit organischer Säure hatte offensichtlich die Oberfläche der Patches so verändert, dass diese deutlich besser besiedelt werden konnte.

Auch bei der Verwendung ganzer SKL bestätigte sich diese Beobachtung (Ergebnisse 5.2.2.2.), denn nach 21 Tagen zeigte sich eine gute partielle Besiedelung, die ca. 50% des Materials bedeckte. So war es durch die Behandlung mit 10% AS bzw. ZS und anschließender 24-stündiger Spülung in M199 gelungen, GA-fixiertes porcines Herzklappenmaterial stabil zu beschichten. Jedoch war es nicht möglich, dabei einen konfluenten Endothelzellrasen zu etablieren.

#### **6.4. Einfluss einer Fibroblastenvorbeschichtung auf die Endothelialisierung**

Nach Spülung und Säurebehandlung schien immer noch eine Komponente zur dauerhaften konfluenten Endothelialisierung von GA-fixiertem Material zu fehlen. Steinhoff et al. hatten im Jahr 2000 gezeigt, dass unfixierte Allografts, die mit Myofibroblasten vorbeschichtet worden waren, auch nach vierwöchiger *in vivo* Bendigung im Schaf konfluent blieben.

Daten der vorliegenden Arbeit (Ergebnisse 5.2.2.1.) gaben einen Hinweis darauf, dass die primäre Zellanhaftung vom Zelltyp abhängen könnte, denn Fibroblasten konnten sowohl auf mit NaCl als auch auf mit M199 gespültem Material deutlich besser adhäreren als Endothelzellen.

Weiter resultierte die Vorbeschichtung mit Fibroblasten auf kurz gespültem Material in einer stabilen, wenn auch nicht konfluenten Besiedelung mit Endothelzellen im Gegensatz zu Material, auf das zuvor keine Fibroblasten aufgebracht worden war. Die Fibroblasten boten den Endothelzellen offensichtlich eine Möglichkeit zur Adhäsion. Bei dichterem Fibroblastenbesiedelung, wie sie bei dem M199 gespülten Material zu beobachten war, war die Endothelialisierung nach 21 Tagen fast konfluent. Ein Grund für den positiven Einfluss, den Fibroblasten auf die Endothelialisierbarkeit des verwendeten porcinen Materials zeigten, dürfte sein, dass dadurch eine physiologische Situation simuliert wurde: Unter dem Endothel in allen größeren Blutgefäßen liegt *in vivo* ein Bindegewebsnetz, das viele Fibroblasten enthält, wobei die Endothelzellen selbst immer einer Basalmembran aufsitzen, die sie von diesem Gewebe trennt. Die Fähigkeit von Endothelzellen, konfluent zu adhären, hängt in einem hohen Maß von dieser Basalmembran ab. Die Zellen selbst produzieren das Strukturprotein Kollagen IV und das Adhäsionsmolekül Laminin, beides Hauptbestandteile der Basallamina (*Voss und Rauterberg, 1986; Timpl, 1989; Grant et al., 1990; Kirkpatrick et al., 1990; Timpl und Brown, 1996*). Die *Lamina fibroreticularis*, ebenfalls Teil der Basalmembran, wird hingegen von Fibroblasten gebildet. Dabei synthetisieren diese Zellen z.B. fibrilläre Proteine (Kollagen I und III) und das Adhäsionsmolekül Fibronectin. Außerdem spielen Fibroblasten eine wichtige Rolle bei der Regeneration von Endothelzellen (*Weiss, 1988*).

Auch andere Arbeitsgruppen schienen davon auszugehen, dass den Endothelzellen zur Adhäsion ein physiologischer Untergrund angeboten werden muss, da bei den meisten bisherigen Endothelialisierungsversuchen die zu beschichtende Matrix mit Fibronectin vorbeschichtet wurde. Mit Fibronectin alleine wurde aber nur eine Komponente des Spektrums verwendet, dass Fibroblasten bieten können. Abgesehen davon, dass diese Versuche nicht erfolgreich waren, wäre Fibronectin für eine spätere klinische Anwendung derzeit nicht verwendbar, da bisher das aufwendige Zulassungsverfahren für den *in vivo* Einsatz nicht durchgeführt wurde.

## **6.5. Kombination von Spülung, Säure und Fibroblastenvorbeschichtung auf die Endothelialisierung**

Nachdem die 24-stündige Spülung in M199 das porcine Gewebe für Endothelzellen partiell besiedelbar gemacht hatte (Diskussion 6.2.), die Behandlung mit 10% AS bzw. ZS diesen Effekt noch deutlich verbessern konnte (Diskussion 6.3.) und eine Vorbeschichtung von gespültem Material mit autologen Fibroblasten (Diskussion 6.4.) eine stabile, wenn auch nicht konfluente Endothelialisierung ermöglicht hatte, wurde schließlich untersucht, welchen Erfolg

eine Endothelialisierung des Materials nach einer Kombination aller drei Vorbehandlungen haben würde.

Zunächst zeigte der Vergleich der gemittelten Daten, die 21 Tage nach Endothelialisierung bei den Versuchen ohne Säure (Ergebnisse 5.2.2.1.) erfasst worden waren, keinen großen Unterschied zu denen mit Säure (Ergebnisse 5.2.2.2.). Die besiedelte Fläche lag bei 80 bzw. 90%. Dies würde nahe legen, dass vor allem die Vorbeschichtung von Fibroblasten einen entscheidenden positiven Einfluss auf eine erfolgreiche Endothelialisierung des gespülten porcinen Materials gehabt hatte. Betrachtete man jedoch die Einzeldaten der untersuchten Klappen, war zu erkennen, dass bei beiden Klappen ohne Säurebehandlung die Fläche zu 80% besiedelt war, während vier der alternativ behandelten Klappen zu mehr als 95% und damit konfluent mit Zellen bedeckt waren. Nur eine Klappe, die nicht kryopräserviert worden war (Diskussion 6.6.) war nur zu 65% besiedelt und verschlechterte so die Mittelwerte. Außerdem zeigten die Herzklappen, die über diesen Zeitpunkt hinaus nachverfolgt wurden auch nach 30 und mehr Tagen eine stabile Zellbesiedelung. Allerdings nahm die Konfluenz ab, was möglicherweise an der *in vitro* Situation lag: Endothelzellen stehen *in vivo* unter Scherstress, einer tangential an der Gefäßwand angreifenden Kraft. Diese stellt einen wichtigen physiologischen Reiz für die Zellen dar (Ballermann *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 2001). Fehlt dieser Reiz über einen längeren Zeitraum, können die Zellen ihre Adhärenz verlieren und sogar in Apoptose übergehen (Kaiser *et al.* 1997; Kaiser *et al.*, 1999).

## **6.6. Einfluss der Kryopräservierung auf die Endothelialisierung**

Von insgesamt sieben GA-fixierten SKL, die mit Säure behandelt, in M199 gespült und mit Fibroblasten vorbeschichtet worden waren, waren fünf kryopräserviert und zwei nicht. Die fünf aufgetauten SKL waren noch mindestens 21 Tage nach der Endothelialisierung konfluent mit vitalen Zellen besiedelt (Ergebnisse 5.2.2.2.), während ein Teil der Endothelzellen auf den beiden nicht kryopräservierten SKL bereits nach 14 bzw. 16 Tagen die Adhäsion verloren (Ergebnisse 5.2.2.2. und 5.2.2.3.). Lupinetti *et al.* hatten 1993 veröffentlicht, dass Homografts durch eine Kryopräservierung 84% ihres Endothels verloren. Im Gegensatz dazu zeigten nicht eingefrorenen Herzklappen ein zu 78% intaktes Endothel. Es ist nun denkbar, dass noch vorhandene porcine Zellen, die auf Grund der nicht erfolgten Kryopräservierung noch an der Matrix anhafteten, bereits eine stabile Neubesiedelung mit Fibroblasten verhinderten, denn die anfänglich gut anhaftenden Fibroblasten hatten auf diesen Klappen nach 7 Tagen zum Großteil ihre Adhärenz verloren. Die Kryopräservierung wiederum schien eine mindestens 7-tägige

Adhärenz von Fibroblasten zu begünstigen, was wiederum zu einer stabilen Endothelialisierung führte.

## **6.7. Endothelialisierung von Bioprothesen**

Die Endothelialisierung von Bioprothesen wurde zusätzlich zu der von SKL vom Schlachthof durchgeführt. Diese Herzklappen waren nicht nur professionell präpariert worden, was zu einer fast völlig zellfreien Matrix führte, sondern wurden neben der Fixierung in 0,2% GA einer Inkubation in AOA unterzogen. Dadurch verminderte sich in der klinischen Anwendung solcher Herzklappenprothesen deren vormalige Kalzifikationsneigung und ihre Haltbarkeit *in vivo* wurde gesteigert (*Girardot et al., 1994*). Die AOA reagierte mit freien Aldehydgruppen der fixierten porcinen Matrix, die sonst als Kalziumbindungsstellen fungiert hätten (*Chen et al., 1994; Schoen et al., 1994*). Allerdings wurde durch diese Reaktion auch die Hydrophilie des Materials durch die Einführung großer hydrophober, aliphatischer Ketten weiter gesenkt.

Die Frage war nun, ob durch das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren, das bereits bei den SKL eine stabile Endothelialisierung ermöglicht hatte, die komplexer behandelten Bioprothesen stabil endothelialisiert werden konnten.

### **6.7.1. Endothelialisierung von Mosaic<sup>®</sup> Bioprothesen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Mosaic<sup>®</sup> Bioprothesen bestanden nur aus Herzklappensegeln, die an einem Gerüst befestigt waren (Material 2.7.3.). Zusätzlich zur Vorbehandlung in AOA interessierte hier, ob dieser Stent Einfluss auf die Zellbeschichtung hatte, indem z.B. im Gerüstmaterial soviel ungebundenes GA gespeichert worden war, dass dieses mit einer 24-stündigen Spülung in M199 nicht effektiv genug entfernt werden konnte. Außerdem könnte der Stent mehr von der verwendeten Säure aufnehmen. Beides hätte die Besiedelung mit Zellen beeinträchtigen können.

Anhand der dargestellten Ergebnisse (5.3.2.1. und 5.3.2.2.) wurde jedoch kein Hinweis auf einen derartigen Einfluss des Stents gefunden. Die Beschichtungsdaten korrelierten mit denen, die für ganze SKL erfasst worden waren (Ergebnisse 5.2.2.1. und 5.2.2.2.).

Bei den Bioprothesen wurden beide Segelseiten beurteilt. Meistens waren beide Seiten im gleichen Maße von Zellen bedeckt. Allerdings gab es auch einen Fall, bei dem die ventrikuläre Seite 24 h nach der Inkubation mit Endothelzellen nur zu 10% mit Zellen besiedelt war, die aortale Seite hingegen zu 80%. Nach 14 Tagen war allerdings auf der aortalen Seite keine anhaftenden Zellen mehr zu finden, während auf der Ventrikularis noch immerhin 30% der

Fläche besiedelt war. Hier war nicht auszuschließen, dass die Segelproben durch die Veränderungen beim Kritisch-Punkt-Trocknen (Ergebnisse 5.1.2.) vertauscht worden waren und so die vormals gut besiedelte Seite zu diesem Zeitpunkt eigentlich noch zu 30% besiedelt war. Trotzdem zeigte dieser Versuch (Ergebnisse 5.3.2.1.), dass sich Endothelzellen auf M199 gespülten gestenteten Bioprothesen 14 Tage partiell adhären konnten. Trotz der schwierigen Handhabung bei der Aufbereitung der Segelproben konnte festgestellt werden, dass diese Prothesen durch die kombinierte Vorbehandlung mit 10% Säure, M199 und autologen Fibroblasten erfolgreich endothelialisiert worden waren. Bereits durch die Vorbeschichtung mit Fibroblasten lag die besiedelte Fläche 21 Tage nach der Inkubation mit Endothelzellen bei 40%. Dieser Wert stieg bei der ventrikulären Seite auf 95% und einer somit konfluenten Besiedelung, wenn zusätzlich mit 10% Säure vorbehandelt worden war. Allerdings lag dieser Wert für die aortale Seite nur bei 73%, da eine Klappe eine Besiedelung von nur 50% gezeigt hatte. Dabei könnte es sich aber um ein Probenartefakt gehandelt haben, bei dem der Zellrasen durch die Probenaufbereitung abgesprengt worden war.

Bei den Mosaic<sup>®</sup> Bioprothesen kann im Grunde nur von einer Tendenz gesprochen werden, da für die Versuche nur wenige Prothesen zur Verfügung standen und so die Fallzahlen für eine sichere Aussage nicht ausreichten. Außerdem war durch die geringe Fläche des zu beschichtenden Materials nur wenig zu überprüfendes Material vorhanden, dass durch die Probenaufbereitung einer relativ starken Artefaktbildung unterworfen war. Sah man die Ergebnisse aber im Zusammenhang mit den bereits für die SKL erfassten, kann ziemlich sicher gesagt werden, dass weder der Stent noch die Behandlung mit AOA einen negativen Einfluss auf eine Endothelialisierung hatte, wenn das Material mit der in dieser Arbeit entwickelten Behandlung vorbereitet worden war. Die Daten weisen vielmehr darauf hin, dass die Säurebehandlung einen noch positiveren Effekt auf die Beschichtbarkeit hatte als bei den SKL. Ohne Säurebehandlung konnten Fibroblasten und Endothelzellen nach 21 Tagen nur 40% der Fläche besiedeln. Bei den vergleichbaren SKL lag dieser Wert bei 75%.

### **6.7.2. Endothelialisierung von Freestyle<sup>®</sup> Bioprothesen**

Alle in dieser Arbeit beschichteten Freestyle<sup>®</sup> Bioprothesen, die anatomisch den SKL glichen (Material 2.7.3.), zeigten nach der Vorbehandlung mit 10% Säure, M199 und Fibroblasten eine stabile und konfluente Zellbesiedelung nach 28-tägiger Gesamtinkubation (Ergebnisse 5.3.3.). Bei Prothesen, die über diesen Zeitpunkt hinaus beobachtet wurden, lockerte sich der Zellrasen erst nach über 37 Tagen auf. Die Vorbehandlung des Herstellers mit AOA behinderte offensichtlich die Zelladhärenz nach der in dieser Arbeit etablierten Behandlung nicht. Auch

machte es wie bei den SKL keinen Unterschied, ob Ascorbin- oder Zitronensäure eingesetzt wurde (Ergebnisse 5.3.1.2.). Die professionelle Präparation der Herzklappen führte sogar dazu, dass bei der Hälfte der untersuchten Prothesen die Aortenaußenwand ebenfalls konfluent mit Endothelzellen bedeckt war.

Es zeigte sich, dass ebenso wie beim SKL-Material, die Vorbeschichtung mit Fibroblasten eine entscheidende Steigerung des Beschichtungserfolges nach sich zog (Ergebnisse 5.3.1.1.), denn das Gewebe war nach 21 Tagen konfluent mit Endothelzellen beschichtet, während Endothelzellen alleine nur ca. ein Viertel der Fläche bedecken konnten. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Inkubation in 10% Säure eine Adhärenz der Zellen ermöglichte, jedoch nicht zur Konfluenz führte. Erst die Vorbeschichtung mit autologen Fibroblasten führte wahrscheinlich auf Grund dessen, dass sie den Endothelzellen einen physiologischen Untergrund anbieten konnten, zur Bildung eines lückenlosen Endothel.

### **6.8. PKH26-Färbung**

Um zu überprüfen, ob die auf dem porcinen Material gefundenen Zellen tatsächlich die aufgetragenen humanen Zellen waren und um später die Zellen nachverfolgen zu können (z.B. in einem Tierversuch) wurden die Zellen intravital gefärbt und überprüft, ob sie auf dem porcinen Material detektiert werden können. Die Zellen waren eindeutig bei einer Wellenlänge von 560 nm im PKM auf Gefrierschnitten des Gewebes zu finden. Damit war bewiesen, dass es sich bei den gefundenen Zellen um die Zellen aus der verwendeten Kultur handelte und nicht um regenerierte porcine Zellen. Somit ist eine Möglichkeit gegeben, in späteren Versuchen die kultivierten Zellen *in vivo* sicher von *de novo* gebildeten Zellen zu unterscheiden. Bei jeder Zellteilung wird sich der Farbstoff ausdünnen und eine Mischkultur gefärbter und ungefärbter Zellen auf einer untersuchten Probe würde ein Hinweis darauf sein, dass eine physiologische Proliferation der aufgetragenen Endothelzellen stattfand.

### **6.9. Immunhistochemische Nachweise**

Der Beweis dafür, dass die im REM detektierten Zellen vital waren, wurde durch den Nachweis der Synthese spezifischer Substanzen erbracht, die von den verwendeten Fibroblasten und Endothelzellen synthetisiert wurden. Dabei wurde untersucht, ob die Zellen humanes Faktor VIII Antigen und PECAM-1 (CD31) auf ihrer Oberfläche exprimierten. Dies wies sie als Endothelzellen aus. Fibroblasten wurden auf die Expression von Thy-1 (CD90) und Prolyl-4-Hydroxylase überprüft. Außerdem wurde nach den Hauptkomponenten der Basalmembran

gesucht: Kollagen IV und Laminin. Da die verwendeten humanen Antikörper nicht mit den entsprechenden porcinen Proteinen kreuzreagierten, war eine positive Färbung gleichzeitig der Nachweis dafür, dass die Zellen human waren. Ein positiver immunhistochemischer Nachweis auch nach mehrwöchiger Inkubation bewies, dass die Zellen zumindest einen Teil ihrer physiologischen Funktion auf der von ihnen besiedelten Matrix aufrecht erhalten hatten.

### **6.9.1. Der Nachweis von Faktor VIII Antigen und CD31**

Auf allen untersuchten porcinen Matrices die in dieser Arbeit beschichtet wurden, konnte bei den detektierten Zellen die Expression von Faktor VIII Antigen und CD31 nachgewiesen werden. War bereits im REM nur eine partielle bzw. verstreute Besiedelung mit Zellen zu sehen, zeigten die positiv gefärbten Zellen auch im Gefrierschnitt ein ähnliches Muster. Das Klappenmaterial, das mit 10% Säure, M199 und Fibroblasten vorbehandelt worden war, zeigte bei der immunhistochemischen Untersuchung einen lückenlos gefärbten Zellverband. Durch die größere Anzahl positiver Zellen war die Intensität der Färbung deutlich stärker ausgeprägt. Allerdings könnte die stärkere Reaktion mit dem CD31-Antikörper auf konfluenten Proben zusätzlich daran gelegen haben, dass PECAM-1, dem eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion von Endothelzellen zugeschrieben wird (*De Lisser et al., 1993*), das Molekül verstärkt im Bereich des Zell-Zell-Kontakts exprimiert (*Albelda et al., 1991; Newman and Albelda 1992*).

Diese Nachweise zeigten, dass die aufgebrachten Zellen vital waren. Die Expression der beiden Moleküle auf dem nur partiell besiedelten Material, war ein Indiz dafür, dass die Zellen nicht aus Gründen eingeschränkter Vitalität nicht konfluent wurden.

### **6.9.2. Der Nachweis von Prolyl-4-Hydroxylase und CD90**

Der Antikörper gegen humanes CD90, das nur von Fibroblasten exprimiert wird, konnte erst im Laufe der Arbeit eingesetzt werden, erwies sich dann jedoch als sehr effektiv beim Nachweis dieser Zellen nach einer erfolgten Endothelialisierung. Bei besonders guten Gefrierschnitten konnten die positiv gefärbten Zellen unter den nicht gefärbten Endothelzellen detektiert werden. Die Expression von Prolyl-4-Hydroxylase konnte nur vor der Inkubation mit Endothelzellen nachgewiesen werden, da Endothelzellen dieses Protein ebenfalls synthetisierten. Die untersuchten Fibroblasten erwiesen sich durch ihre Synthese der untersuchten Proteine als vital. Auf allen Proben, die nach 24-stündiger Fibroblasteninkubation auf die Expression von Prolyl-4-Hydroxylase untersucht wurden, wurden positiv gefärbte Zellen gefunden. Bei Material das

ohne Säurebehandlung beschichtet worden war, lagen die positiven Zellen sehr verstreut (Ergebnisse 5.2.2.1.), was mit den REM Daten, die eine partielle Besiedelung zeigten, korrelierte. Die Proben, die mit dem CD90-Antikörper inkubiert worden waren, zeigten eine ähnliche Verteilung gefärbter Zellen bei Material dieser Gruppen (Ergebnisse 5.3.2.1.). Der Nachweis mit dem CD90-Antikörper nach der Endothelzellinkubation war in den meisten Fällen positiv und zeigte die Anwesenheit von humanen Fibroblasten. Bei Proben der Gruppe O war die Expression i.d.R. noch am 28. Tag der Kultivierung stark ausgeprägt. War dies nicht der Fall wie bei SKL 15 und Med-10 (Ergebnisse 5.2.2.2. und 5.3.3.), so war auch der Endothelzellrasen im REM nicht konfluent und somit die Beschichtung nicht stabil. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine unzureichende Fibroblastenbesiedelung zu einem schlechten Endothelialisierungsergebnis führte.

### **6.9.3. Der Nachweis von Kollagen IV und Laminin**

Obwohl Endothelzellen an hydrophile Oberflächen adhäreren, wird die Stabilität der Anlagerung v.a. durch die Bildung einer extrazellulären Matrix gewährleistet. Die Zellen selbst synthetisieren hierbei einen Großteil der benötigten Proteine (*Madri und Williams, 1983; Jaffe, 1987; Darnell et al., 1990*). Zur Bildung einer intakten Basalmembran werden jedoch auch Proteine benötigt, die von Fibroblasten gebildet werden (Diskussion 6.4.).

Beim Nachweis von Kollagen IV bzw. Laminin auf den besiedelten Proben dieser Arbeit wurden starke und schwache Farbreaktion beobachtet, je nach dem wie das beschichtete Material vorbehandelt worden war. Im Gegensatz zu den anderen immunhistochemischen Nachweisen (siehe oben), bei denen man die Verteilung der positiven Zellen sehen konnte, führte das Vorhandensein von Kollagen IV bzw. Laminin zu einer diffusen Färbung der besiedelten Fläche im oberen Bereich der Matrix.

Das Material, das nur mit Endothelzellen inkubiert worden war (Gruppen B, F und H), zeigte keine oder nur eine schwache Reaktion mit den verwendeten Antikörpern (Ergebnisse 5.2.2.1., 5.2.2.2., 5.3.1.1. und 5.3.2.1.). Wurden zusätzlich Fibroblasten vorbeschichtet, jedoch keine Säure verwendet (Gruppe M), war die immunhistochemische Reaktion ebenfalls nur schwach ausgeprägt (Ergebnisse 5.2.2.1. und 5.3.2.1.). Wurde das Material jedoch der kompletten Vorbehandlung unterzogen (Gruppe O), zeigte eine starke Farbreaktion (Ergebnisse 5.2.2.2., 5.3.2.2. und 5.3.3.), dass die Zellen viel Kollagen IV bzw. Laminin synthetisiert hatten. Dies war ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich eine physiologische Basalmembran gebildet hatte.

Bei den nicht kryopräservierten SKL, bei denen der Endothelzelleppich nicht konfluent war (Gruppe P), war auch die Färbung mit Kollagen IV und Laminin nur schwach zu sehen oder überhaupt nicht nachweisbar (Ergebnisse 5.2.2.2. und 5.2.2.3.).

### **6.10. Einfluss der Zellzahl auf das Beschichtungsergebnis**

Die meisten Arbeitsgruppen, die versucht hatten, GA-fixiertes porcines Klappenmaterial zu besiedeln, wobei es sich v.a. um Teilstücke handelte, setzten zwischen  $0,44$  und  $3,0 \times 10^5$  Endothelzellen/cm<sup>2</sup> ein (Eberl et al., 1992; Fischlein et al., 1992; Bengtsson et al., 1993; Fischlein et al., 1994; Lehner et al., 1997). Zusätzlich wurde das Material i.d.R. mit Fibronectin vorbeschichtet. Selbst wenn ganze Klappen verwendet wurden, wurde nur mit einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^6$  beschichtet (Trantina-Yates et al., 2001). Wie bereits erwähnt, waren die Beschichtungserfolge mäßig.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Zellmengen lagen, besonders bei der Beschichtung ganzer Klappen, oft um mindestens eine Zehnerpotenz höher. Die eingesetzte Fibroblastenzellzahl lag bei der Beschichtung von 18 von 21 Herzklappen bei mindestens  $0,5 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> (maximal  $1,6 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup>). Zwei weitere Klappen wurden mit  $0,4 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> (SKL 8 und 13) beschichtet und eine mit  $0,2 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> (SKL 16). Endothelzellen wurden auf 29 Klappen aufgebracht, davon wurden 25 mit mindestens  $0,5 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> (maximal  $6,3 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup>) beschichtet. Zwei Klappen wurden mit  $0,4 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> (SKL 18 und Med-11) und eine Klappe wurde mit  $0,3 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> (Med-10) Zellen inkubiert. Die Bioprothese Med-1 wurde mit  $0,2 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> Zellen beschichtet.

Es stellte sich die Frage, ob die eingesetzte Zellzahl den Beschichtungserfolg beeinflusste.

Med-1 zeigte keine Endothelzellbesiedelung nachdem sie mit  $0,2 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> Endothelzellen inkubiert worden war. Die autologen Fibroblasten ( $1,6 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup>) adhärten hingegen über 28 Tage stabil auf der Klappe. Für die fehlgeschlagene Endothelialisierung konnte die schlechte Kulturqualität verantwortlich gemacht werden, da die Zellen vor der Beschichtung nicht mehr konfluent geworden waren, was zeigte, dass die Zellen ihre Proliferationsfähigkeit eingebüßt hatten. Bereits bei der Inkubation war eine wichtige Funktion der Zellen, ihre Fähigkeit zur Adhärenz, verloren gegangen: nur noch 25% der Zellen waren in der Lage, auf der Klappe anzuhaften (Ergebnisse 5.3.2.2.). Diese proliferierten auf der Herzklappe nicht mehr und waren nicht in der Lage die Klappe zu besiedeln.

Die nicht konfluente Besiedelung der SKL 18 (Gruppe P) konnte ebenfalls nicht auf eine zu geringe Beschichtungszellzahl zurück geführt werden. Zwar wurde diese Klappe nur mit  $0,5$  bzw.  $0,4 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> besiedelt und über die Hälfte der anfänglich adhärierenden Zellen

verlor die Haftung 14 Tage nach der Beschichtung mit Endothelzellen (Ergebnisse 5.2.2.3.), aber die andere SKL dieser Gruppe (SKL15), die mit  $1,6$  bzw.  $2,8 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> beschichtet worden war (Ergebnisse 5.2.2.2.), verlor ihre Zellen ebenfalls im vergleichbaren Zeitraum. Der Grund hierfür könnte die nicht erfolgte Kryopräservierung dieser beiden Klappen gewesen sein (Diskussion 6.6.).

Die nicht-säurebehandelten Herzklappen (SKL 1 bis 8 und Med-5 und -6) wurden mit mindestens  $0,4$  und maximal mit  $6,3 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> Endothelzellen beschichtet. SKL 5 bis 8 und Med-5 waren zuvor mit mindestens  $0,6$  und maximal  $1,5 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> Fibroblasten inkubiert worden. All diese Klappen zeigten ein schlechtes Beschichtungsergebnis. Material, das der kompletten, in dieser Arbeit konzipierten Vorbehandlung unterzogen worden war, zeigte hingegen fast immer eine konfluente und stabile Zellbeschichtung. Die Klappen (SKL 12 bis 16 und Med-3, 4 und 9 bis 11) waren mit  $0,3$  bis  $3,0 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> Endothelzellen und zuvor mit  $0,4$  bis  $1,6 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> Fibroblasten besiedelt worden.

Die Anzahl der Fibroblasten schien nicht entscheidend, denn SKL 16 (Ergebnisse 5.2.2.2.) zeigte eine sehr stabile Besiedelung über 41 Tage, obwohl sie mit nur  $0,2 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> Fibroblasten beschichtet worden war. Allerdings betrug die Menge aufgetragener Endothelzellen  $2,7 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup>. Andererseits war die Besiedelung von Med-10 nicht erfolgreich, obwohl deutlich mehr Fibroblasten aufgebracht wurden ( $0,6 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup>). Die Endothelzellzahl lag bei  $0,3 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup>. Daraus könnte man schließen, dass die Anzahl an Endothelzellen für eine erfolgreiche Endothelialisierung ausschlaggebend sein könnte und ein Schwellenwert von  $0,3 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> nicht unterschritten werden sollte. Vielmehr sah es aber so aus, als läge die Stabilität der Endothelialisierung u.a. an der Qualität der vorbeschichteten Fibroblasten. Im Falle der Bioprothese Med-10 hatten sich diese bereits vor der Inkubation mit den Endothelzellen zum Großteil gelöst, was die Folge hatte, dass diese keinen optimalen Untergrund zur dauerhaften Adhäsion vorfanden.

Anhand der vorliegenden Daten ließ sich folglich eine Korrelation zwischen der Beschichtungszellzahl und dem Beschichtungserfolg weder ableiten noch ausschließen. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, müsste eine größere Anzahl gleich behandelter Prothesen mit der gleichen Anzahl an Fibroblasten und Endothelzellen besiedelt werden.

# ZUSAMMENFASSUNG

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die dauerhafte *in vitro* Beschichtung von GA-fixierten porcinen Herzklappen mit humanen Endothelzellen aus der *Vena saphena magna* erreicht werden. Dabei sollte die These untermauert werden, dass dies durch eine Erhöhung bzw. Wiederherstellung der hydrophilen Oberfläche der zu beschichtenden Matrix und die Schaffung eines physiologischen Untergrunds durch eine Vorbeschichtung mit autologen Fibroblasten ermöglicht werden kann.

Zur Besiedelung wurden sowohl in 0,2% GA fixierte SKL als auch kommerziell erhältliche Bioprothesen mit und ohne Stent (Medtronic Inc., Minneapolis, Minn., USA) verwendet.

Zelltoxische Mengen GA konnten durch eine 24-stündige Spülung des Materials in M199 effektiv entfernt werden. Das Überleben der Zellen wurde anschließend nicht mehr beeinträchtigt. Allerdings sorgte erst die 5-minütige Inkubation des Materials in einer starken organischen Säure – in diesem Fall Ascorbin- bzw. Zitronensäure – für eine dauerhafte Adhärenz der Zellen auf der porcinen Matrix. Durch die Vorbeschichtung von so behandeltem Material mit autologen Fibroblasten konnte schließlich ein konfluenter Endothelzellrasen etabliert werden, der über 21 Tage stabil blieb.

Die vorliegenden Daten scheinen alle in dieser Arbeit formulierten Thesen zu bestätigen: Erstens musste und konnte die toxische Menge des Fixans durch einen einfachen Spülvorgang eliminiert werden, so dass die aufgetragenen Zellen überlebten.

Zweitens musste die Oberfläche der zu beschichtenden Matrix zumindest einen Teil ihrer hydrophilen Eigenschaften zurück erlangen. Dies konnte offensichtlich durch die Inkubation in einer 10%igen Lösung einer starken organischen Säure erreicht werden, da sowohl Fibroblasten als auch Endothelzellen auf solchem Material über einen längeren Zeitraum adhärten. Außerdem führte die kombinierte Behandlung des Materials mit M199 und Zitronensäure vermutlich zur Bildung einer neuen, artifiziellen Proteinoberfläche, auf der die anschließend aufgetragenen humanen Zellen adhärten konnten.

Drittens musste den verwendeten Endothelzellen zusätzlich eine physiologische Komponente geboten werden, um auf der porcinen Matrix nicht nur zu adhärten, sondern auch zu proliferieren und sie somit in die Lage zu versetzen, die Oberfläche konfluent zu bedecken. Hierzu war die Bildung einer intakten Basalmembran essentiell. Dies wurde durch die

Vorbeschichtung mit autologen Fibroblasten möglich. Die Endothelzellen selbst synthetisierten auf vorbesiedeltem Herzklappenmaterial deutlich mehr Kollagen IV und Laminin, beides wichtige Bestandteile der Basalmembran, als auf fibroblastenfreiem Material. Dies erhöhte die Stabilität des Endothelzellrasens erheblich.

Die erfassten Daten zeigten deutlich, dass GA-fixiertes porcines Herzklappenmaterial nach einer 5-minütigen Behandlung mit 10% AS oder ZS, anschließender Spülung für 24 h in M199 und einer Vorbeschichtung mit Fibroblasten stabil und konfluent mit humanen Endothelzellen besiedelt werden konnten. Dabei war es irrelevant, ob Herzklappen vom Schlachthof oder kommerziell erhältliche Bioprothesen als Matrix verwendet wurden. Bei letzteren zeigte sich außerdem, dass weder die Vorbehandlung in AOA noch ein vorhandener Stent einen negativen Einfluss auf die Endothelialisierung hatte.

Im Anschluss an die Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sollen die gefundenen Daten *in vivo* überprüft werden. Hierzu sollen Bioprothesen nach dem in dieser Arbeit entwickelten Schema vorbehandelt, mit ovinen Fibroblasten und Endothelzellen besiedelt und in Empfängerschafte implantiert werden. Behält das *in vitro* generierte Endothel dabei seine Adhärenz auf der Bioprothese, wäre schließlich eine klinische Studie der nächste Schritt.

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AOA	$\alpha$ -Amino-Ölsäure ( <i>alpha-aminooleic acid</i> )
AS	Ascorbinsäure
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
d	Tag(e) ( <i>day[s]</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
g	Erdbeschleunigung ( $[m/s^2]$ )
GA	Glutaraldehyd
°C	Grad Celsius
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HSA	Humanes Serumalbumin
IgG	Immunglobulin G
l	Liter
M	Mol, molar
Min	Minute(n)

ml	Milliliter ( $l^{-3}$ )
mm	Millimeter ( $m^{-3}$ )
$\mu$ m	Mikrometer ( $m^{-6}$ )
$\mu$ l	Mikroliter ( $l^{-6}$ )
N	normal
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer ( $m^{-9}$ )
OT	Objektträger
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
REM	Rasterelektronenmikroskop
PKM	Phasenkontrastmikroskop
Rpm	Umdrehung pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SKL	Schweineherzklappe
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität ( <i>Unit</i> )
v	Volumen
w	Gewicht ( <i>weight</i> )
ZS (CS)	Zitronensäure ( <i>citric acid</i> )

## LITERATURVERZEICHNIS

### 9. Literaturverzeichnis

Albelda SM., Muller WA., Buck CA., Newman PJ. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 1991 Sep; 114 (5): 1059 – 1068.

Ballermann BJ., Dardik A., Eng E., Liu A. Shear stress and the endothelium. *Kidney int Suppl.* 1998 Sep; 67: 100 – 108.

Banbury MK., Cosgrove DM. 3rd, Lytle BW., Smedira NG., Sabik JF., Saunders CR. Long-term results of the Carpentier-Edwards pericardial aortic valve: a 12-year follow-up. *Ann Thorac Surg.* 1998 Dec; 66 (6 Suppl): 73 – 76.

Barratt-Boyes BG., Roche AH., Subramanian R., Pemberton JR., Whitlock RM. Long-term follow-up of patients with the antibiotic-sterilized aortic homograft valve inserted freehand in the aortic position. *Circulation.* 1987 Apr; 75 (4): 768 – 777.

Bengtsson L., Haegerstrand A., Gillis C. Serial cultivation of adult human endothelium from the great saphenous vein. *J. Vasc. Surg.* 1992; 16: 280 – 285.

Bengtsson L., Phillips R., Haegerstrand A. In vitro endothelialization of photooxidatively stabilized xenogeneic pericardium. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 365 – 368.

Bengtsson L., Radegran K., Haegerstrand A. In vitro endothelialization of commercially available heart valve bioprostheses with cultured adult human cells. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 1993; 7: 393 – 398. [1]

Bengtsson L., Ragnarson B., Haegerstrand A. Lining of viable and nonviable allogeneic and xenogeneic cardiovascular tissue with cultured adult human venous endothelium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106: 434 – 443. [2]

Bernal JM., Rabasa JM., Cagigas JC., Echevarria JR., Carrion MF., Revuelta JM. Valve-related complications with the Hancock I porcine bioprosthesis. A twelve- to fourteen-year follow-up study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991 May; 101 (5): 871 – 880.

Binet JP., Carpentier A., Langlois J., Duran C., Colvec P. Implantation de valves heterogenes dans le traitement de cardiopathies aortiques. *C R Acad SC Paris* 1965; 261: 5733 – 5734.

Bortolotti U., Milano A., Mazzucco A., Valfre C., Talenti E., Guerra F., Thiene G., Gallucci V. Results of reoperation for primary tissue failure of porcine bioprostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985 Oct; 90(4): 564 – 569.

Butchart EG., Li HH., Payne N., Buchan K., Grunkemeier GL. Twenty years' experience with the Medtronic Hall valve. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Jun; 121(6): 1090-1100.

Chen W., Schoen FJ., Levy RJ. Mechanism of efficacy of AOA for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves. *Circulation* 1994; 90: 323 – 329.

- Clark RE., Finke EH. Scanning and light microscopy of human aortic leaflets in stressed and relaxed states. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1974; 67: 792 – 804.
- Corbineau H., De La Tour B., Verhoye JP., Langanay T., Lelong B., Leguerrier A. Carpentier-Edwards supraannular porcine bioprosthesis in aortic position: 16-year experience. *Ann Thorac Surg*. 2001 May; 71 (5 Suppl): 228 – 231.
- Curtis A., Pegg DE., Wilson A. Repopulation of freeze-dried porcine valves with human fibroblasts and endothelial cells. *J Heart Valve Dis.* 1997 May;6 (3): 296 – 306.
- Darnell J., Lodish H., Baltimore D. *Molecular cell biology*. 2<sup>nd</sup> edition 1990; Scientific American Books. 906 – 915.
- David TE., Pollick C., Bos J. Aortic valve replacement with stentless porcine aortic bioprosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1990 Jan; 99 (1): 113 – 118.
- David TE., Feindel CM., Scully HE., Bos J., Rakowski H. Aortic valve replacement with stentless porcine aortic valves: a ten-year experience. *J Heart Valve Dis.* 1998 May; 7 (3): 250 – 254.
- DeLisser HM., Yan HC., Newman PJ., Muller WA., Buck CA., Albelda SM. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 1993 Jul 25; 268 (21): 16037 – 16046.
- Deutsch M., Meinhart J., Vesely M., Fischlein T., Groscurth P., von Oppell U., Zilla P. In vitro endothelialization of expanded polytetrafluorethylene grafts: A clinical case report after 41 months. *J. Vasc. Surg.* 1997; 25: 757 – 763.
- Doty JR., Salazar JD., Liddicoat JR., Flores JH., Doty DB. Aortic valve replacement with cryopreserved aortic allograft: ten-year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Feb; 115(2): 371 – 379; discussion 379 – 380.
- Eberl T., Siedler S., Schumacher B., Zilla P., Schlaudraff K., Fasol R. Experimental in vitro endothelialization of cardiac valve leaflets. *Ann Thorac Surg.* 1992 Mar; 53 (3): 487 – 492.
- Esmon CT. The regulation of natural anticoagulated pathways. *Science* 1987; 235 (4794): 1348.
- Fajardo LF. The complexity of endothelial cells. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 241 – 250.
- Fischlein T., Lehner G., Lante W., Reichart B. Endothelialization of aldehyde-fixed cardiac valve bioprostheses. *Transplant Proc.* 1992 Dec; 24 (6): 2988.
- Fischlein T., Lehner G., Lante W., Fittkau M., Murphy JG., Weinhold CH., Reichart B. Endothelialization of cardiac valve bioprostheses. *Int J Artif Organs.* 1994 Jun; 17 (6): 345 – 352.
- Fischlein T., Schutz A., Haushofer M., Frey R., Uhlig A., Detter C., Reichart B. Immunologic reaction and viability of cryopreserved homografts. *Ann Thorac Surg.* 1995 Aug; 60 (2 Suppl): 122 – 125; discussion 125 – 126.

- Fischlein T., Fasol R. In vitro endothelialization of bioprosthetic heart valves. *J Heart Valve Dis.* 1996 Jan; 5 (1): 58 – 65.
- Fisher AB., Chien S., Barakat AI., Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281: 529 – 533.
- Fridman R., Alon Y., Doljanski F., Fuks Z., Vlodavsky I. Cell interaction with the extracellular matrices produced by endothelial cells and fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 1985; 158: 461 – 476.
- Fu P., Lan H., Wang D., Guan H. Experimental study on modified treatment and endothelialization of bovine pericardial valves. *J Tongji Med Univ.* 1997; 17: 136 – 139.
- Gendler E., Gendler S., Nimmi M. Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis. *J Biomed Mater Res* 1984; 18: 727 – 736.
- Girardot NM., Torrianni M., Girardot JM. Effect of AOA on glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve cusps and walls: binding and calcification studies. *Int J Artif Organs* 1994; 17: 76 – 82.
- Golomb G., Schoen FJ., Smith MX., Linden J., Dixon M., Levy RJ. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *Am J Pathol* 1987; 127: 122 – 130.
- Gott JP., Girardot MN., Girardot JM., Hall JD., Whitlark JD., Horsley WS., Dorsey LM., Levy RJ., Chen W., Schoen FJ., Guyton RA. Refinement of the alpha aminooleic acid bioprosthetic valve anticalcification technique. *Ann Thorac Surg.* 1997 Jul; 64(1): 50 – 58.
- Grant DS., Kleinman HK., Martin GR. The role of basement membranes in vascular development. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 588: 61 – 72.
- Haegerstrand A., Gillis C., Bengtsson L. Serial cultivation of adult human endothelium from the great saphenous vein. *J Vasc Surg.* 1992; 16: 280 – 285.
- Harlan JM. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood* 1985; 65: 513.
- Hoch J., Dryjski M., Jarrell BE., Carabasi RA., Williams SK. *In vitro* endothelialization of an aldehyde-stabilized native vessel. *J Surg. Res.* 1988; 44: 545 – 554.
- Hoffmann D., Gong G., Liao K., Macaluso F., Nikolic SD., Frater RW. Spontaneous host endothelial growth on bioprostheses. *Circulation.* 1992; 16: 280 – 285.
- Holper K., Wottke M., Lewe T., Baumer L., Meisner H., Paek SU., Sebening F. Bioprosthetic and mechanical valves in the elderly: benefits and risks. *Ann Thorac Surg.* 1995 Aug; 60 (2 Suppl): 443 – 446.
- Horan PK., Slezak SE. Stable cell membrane labeling. *Nature* 1989; 340: 167 – 168.
- Hormia M., Lehto V-P., Virtanen I. Factor VIII-related Antigen. A pericellular matrix component of cultured human endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 1983; 149: 483 – 497.

Human P., Zilla P. Inflammatory and immune processes: the neglected villain of bioprosthetic degeneration? *J Long Term Eff Med Implants*. 2001; 11 (3-4): 199 – 220.

Johnson TE., Umbenhauer DR., Hill C., Mueller SN., Levine EM. Nichols WW. Karyotypic and phenotypic changes during in vitro aging of human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1992; 150: 17 – 27.

Junquiera LC., Carniero J., Kelly RO. *Basic Histology*, 8th ed., A Lange Medical Book, Apleton & Lange, 1995.

Jaffe EA., Nachmann RL., Becker CG., Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52: 2745 – 2756.

Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 1987; 18: 234 – 239.

Johnson DL., Rose ML., Yocoub MH. Immunogenicity of human heart valve endothelial cells and fibroblasts. *Transplantation proceedings* 1997; 29: 984 – 985.

Kaiser D., Freyberg MA., Friedl P. Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Feb 24; 231 (3): 586 – 590.

Kaiser D., Freyberg MA., Schrimpf G., Friedl P. Apoptosis induced by lack of hemodynamic forces is a general endothelial feature even occurring in immortalized cell lines. *Endothelium*. 1999; 6 (4): 325 – 334.

Kirali K., Guler M., Tuncer A., Daglar B., Ipek G., Isik O., Yakut C. Fifteen-year clinical experience with the biocor porcine bioprostheses in the mitral position. *Ann Thorac Surg*. 2001 Mar; 71 (3): 811 – 815.

Kirkpatrick CJ., Kampe M., Fischer EG., Rixen H., Richter H., Mittermayer C. Differential expansion of human endothelial monolayers on basement membrane and interstitial collagens, laminin and fibronectin in vitro. *Pathobiology* 1990; 58 (4): 221 – 225.

Kumar P., Athanasiou T., Mussa S., Wood AJ. Ten year experience with Aspire (Tissuemed) porcine bioprosthesis: single centre experience. *Cardiovasc Surg*. 2003 Apr; 11 (2): 131 – 137.

Lehner G., Fischlein T., Baretton G., Murphy JG., Reichart B. Endothelialized biological heart valve prostheses in the non-human primate model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1997 Mar; 11 (3): 498 – 504.

Levy RJ., Vyavahare N., Ogle M., Ashworth P., Bianco R., Schoen FJ. Inhibition of cusp and aortic wall calcification in ethanol- and aluminum-treated bioprosthetic heart valves in sheep: background, mechanisms, and synergism. *J Heart Valve Dis*. 2003 Mar; 12 (2): 209 – 216; discussion 216.

Liao K., Gong, G., Hoffman D., Seifter E., Factor S.M. Macaluso F., Frater R.W.M. Spontaneous host endothelial growth on bioprosthetic valves and its relation to calcification. *Eur. J. Cardio-thorac. Surg*. 1993; 7: 591 – 596.

Lindl T. Zell und Gewebekultur, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage,,: Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg/Berlin, 2001.

Leather RP., Shah DM., Buchbinder D., Annest SJ., Karmody AM. Further experience with the saphenous vein used *in situ* for arterial bypass. Amer J Surg. 1985; 142: 506.

Lehner G., Fischlein T., Baretton G., Murphy J.G., Reichart B. Enothelialized biological heart valves prostheses in the non-human primate model. Eur J Cardiothorac Surg. 1997; 11: 498 – 504.

Lupinetti FM., Tsai TT., Kneebone JM., Bove EL. Effect of cryopreservation on the presence of endothelial cells on human valve allografts. J Thorac Cardiovasc Surg. 1993 Nov; 106(5): 912 – 917.

Madri JA., Williams SK. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. J Cell Biol. 1983 Jul; 97 (1): 153 – 165.

Magilligan DJ., Lewis SW., Heinzerling RH., Smith D. Fate of a second porcine bioprosthetic valve. J Thorac Cardiovasc Surg. 1983; 8: 362 – 370.

Malassagne B., Taboit F., Conti F., Batteux F., Atia N., Chéreau C., Conjeaud H., Théron M.-C., Attal J., Braet F., Houdebine L.-M., Calmus Y., Houssin D., Weill B. A newly established porcine aortic endothelial cell line: Characterization and application to the study of human-to-swine graft rejection. Exp. Cell Res. 1998; 238: 90 – 100.

Moritz A., Grimm M., Eybl E., Grabenwoger M., Windberger U., Dock W., Bock P., Wolner E. Improved biocompatibility by postfixation treatment of aldehyde fixed bovine pericardium. ASAIO Trans. 1990 Jul-Sep; 36 (3): M300 – 303.

Myken P., Bech-Hanssen O., Phipps B., Caidahl K. Fifteen years follow up with the ST. Jude Medical Biocor porcine bioprosthesis. J Heart Valve Dis 2000; 9:415 – 422.

Newman PJ., Albelda SM. Cellular and molecular aspects of PECAM-1. Nouv Rev Fr Hematol. 1992; 34 Suppl: 9 – 13.

Nimni ME., Cheung D., Strates B., Kodama M., Sheikh K. A natural biomaterial for tissue replacement. J Biomed Mater Res 1987; 21: 741 – 771.

Oei FBS., Welters MJ., Vaessen LM., Stegmann AP., Bogers AJ., Weimar W. Induction of cytotoxic T lymphocytes with destructive potential after cardiac valve homograft implantation. J Heart Valve Dis. 2000 Nov; 9(6): 761 – 768.

Plattner H., Zingsheim HP. Elektronenmikroskopische Methoden in der Zell- und Molekularbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1987.

Richter G. Praktische Biochemie, Thieme Verlag, Stuttgart, 2003: 230

Ross D. Homograft replacement of the aortic valve. J Cardiovasc Surg (Torino). 1965 Sep 5 – 18; Suppl: 89 – 94.

Ross D., Jackson M., Davies J. Pulmonary autograft aortic valve replacement: long-term results. *J Card Surg.* 1991 Dec; 6 (4 Suppl): 529 – 533.

Sidiropoulos A., Hotz H., Tschesnow J., Konertz W. Stentless porcine bioprostheses for all types of aortic root pathology. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1997 May; 11 (5): 917 – 921.

Schoen FJ., Hobson CE. Anatomic analysis of removed prosthetic heart valves: causes of failure of 33 mechanical valves and 58 bioprostheses, 1980 to 1983. *Hum Pathol.* 1985 Jun; 16 (6): 549 – 559.

Schoen FJ., Levy RJ., Nelson AC., Bernhard WF., Nashef A., Hawley M. Onset and progression of experimental bioprosthetic heart valve calcification. *Lab Invest* 1985; 52: 523 – 532.

Schoen FJ., Tsao JW., Levy RJ. Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses: Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization. *Am J Pathol* 1986; 123: 323 – 328.

Schoen FJ., Harasaki H., Kim K., Anderson HC., Levy RJ. Biomaterial-associated calcification: pathology, mechanisms, and strategies for prevention. *J Biomed Mater Res.* 1988 Apr; 22(A1 Suppl):11-36. Review.

Schoen FJ., Levy RJ. Pathology of substitute heart valves: new concepts and developments. *J Card Surg.* 1994 Mar; 9 (2 Suppl): 222 – 227.

Schoen FJ., Hirsch D., Bianco RW., Levy RJ. Onset and progression of calcification in porcine aortic bioprosthetic valves implanted as orthotopic mitral valve replacements in juvenile sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994; 108: 880 – 887.

Schutz A., Fischlein T., Breuer M., Haushofer M., Uhlig A., Detter C., Kemkes BM., Hammer C., Reichart B. Cytoimmunological monitoring after homograft valve replacement. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1994; 8 (11): 609 – 612.

Sharefkin JB., Van Wart HE., Cruess DF. Albus RA., Levine EM. Adult human endothelial cell enzymatic harvesting: estimates of efficiency and comparison of crude and partially purified bacterial collagenase preparations by replicate microwell culture and fibronectin degradation measure by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vasc Surg* 1986; 4: 567 – 577.

Sidhu P., O'Kane H., Ali N., Gladstone DJ., Sarsam MA., Campalani G., MacGowan SW. Mechanical or bioprosthetic valves in the elderly: a 20-year comparison. *Ann Thorac Surg.* 2001 May; 71(5 Suppl): 257 – 260.

Simon A., Wilhelmi M., Steinhoff G., Harringer W., Brücke P., Haverich A. Cardiac valve endothelial cells: Relevance in the long-term function of biologic valve prostheses. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1998; 116: 609 – 616.

Speer DP., Chvapil M., Eskelson CD., Ulreich J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 1980 Nov; 14 (6): 753 – 764.

Stansby G., Bergwanger C., Shukla N., Schmitz-Rixen T., Hamilton G. Endothelial seeding of compliant polyurethane vascular graft material. *Br. J. Surg.* 1994; 81: 1286 – 1289.

Steinhoff G., Stock U., Karim N., Mertsching H., Timke A., Meliss RR., Pethig K., Haverich A., Bader A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: *in vivo* restoration of valve tissue. *Circulation* 2000 Nov 7; 102 (19 Suppl 3): III50 – 55.

Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem.* 1989 Apr 1;180 (3): 487 – 502.

Timpl R., Brown JC. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bio Essays* 1996; 18 (2): 123 – 132.

Thompson MM., Budd JS., Eady SL., Allen KE., James M., James RFL., Bell PRF. Effect of seeding time and density on endothelial cell attachment to damaged vascular surfaces. *Br. J. Surg.* 1993; 80: 359 – 362.

Trantina-Yates AE., Human P., Bracher M., Zilla P. Mitigation of bioprosthetic heart valve degeneration through biocompatibility: *in vitro* versus spontaneous endothelialization. *Biomaterials* 2001; 22: 1837 – 1846.

Tsuchida H., Wilson SE., Ishimaru S. Healing mechanisms of high-porosity PTFE grafts: Significance of transmural structure. *J. Surg. Res.* 1996; 71: 187 – 195.

Van Leeuwen EB., Molema G., de Jong KP., van Luyn MJ., Dijk F., Slooff MJ., Ruiters MJ., van der Meer J., 2000. One-step method for endothelial cell isolation from large human blood vessels using fibrin glue. *Lab Invest.* 2000 Jun; 80(6): 987 – 989.

Voss B., Rauterberg J. Localization of collagen types I, III, IV and V, Fibronectin and Laminin in human arteries by the indirect immunofluorescent method. *Pathol. Res. Pract.* 1986; 181 (5): 568 – 575.

Walther T., Mohr FW. Herzklappen: neue Entwicklung bei biologischen Prothesen. *Deutsche Herzstiftung, Herz heute Heft 1/2001: 18 – 22.*

Weiss L. *Cell and Tissue Biology. A Textbook of Histology.*, Urban und Schwarzenberg Inc. 6th Edition 1988: 361

Weissenstein C., Human P., Bezouidenhout D., Zilla P. Glutaraldehyde detoxification in addition to enhanced amine cross-linking dramatically reduces bioprosthetic calcification in the rat model. *J Heart Valve Dis.* 2000; 9: 230 – 240.

Welters MJ., Oei FB., Witvliet MD., Vaessen LM., Cromme-Dijkhuis AH., Bogers AJ., Weimar W., Claas FH. A broad and strong humoral immune response to donor HLA after implantation of cryopreserved human heart valve allografts. *Hum Immunol.* 2002 Nov; 63(11): 1019 – 1025.

Zetter B.R. The endothelial cells of large and small blood vessels. *Diabetes* 1981; 30 (Suppl. 2): 24 – 28.

Zilla P., Fasol R., Dudeck U., Siedler S., Preiss P., Fischlein T., Müller-Glauser W., Baitella G., Sanan D., Odell J., Reichart B. In situ cannulation, microgrid follow-up and low-density plating provide first passage endothelial cell masscultures for in vitro lining. *J. Vasc Surg* 1990; 12: 180 – 189.

Zilla P., Fullard L., Trescony P., Meinhart J., Bezuidenhout D., Gorlitzer M., Human P., von Oppell U. Glutaraldehyde detoxification of aortic wall tissue: a promising perspective for emerging bioprosthetic valve concepts. *J Heart Valve Dis.* 1997 Sep; 6(5): 510 – 520.

Zünd G., Hoerstrup SP., Schoeberlein A., Lachat M., Uhlschmid G., Vogt PR., Turina M. Tissue engineering: A new approach in cardiovascular surgery; Seeding of human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998 Feb; 13 (2): 160 – 164.

# DANKSAGUNG

## **10. Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Bruno Reichart für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in den Laborräumen der Herzchirurgischen Abteilung bedanken.

Oberarzt Dr. med. Bruno Meiser möchte ich für die Beschaffung der benötigten Arbeitsmittel danken.

PD. Dr. med. Michael Schmoeckel gebührt mein herzlichster Dank für die Übernahme des Erstreferats und die Zeit, die er für die Vorbereitung der Vorprüfung geopfert hat.

Besonderen Dank möchte ich meinem Projektleiter Dr. med. Helmut Gulbins aussprechen, der nicht nur das Thema dieser Arbeit konzipiert, sondern auch die Durchführung im Labor betreut hat. Außerdem hat er durch seine konstruktive Kritik diese Arbeit erst zu dem gemacht, was sie ist.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des herzchirurgischen Zelllabors, Frau Ulrike Haas, unter deren Leitung die immunhistochemischen Nachweise angefertigt wurden und Frau Antje Uhlig, die für die Präparation der Schweineherzklappen verantwortlich war und die das in dieser Arbeit zur Endothelialisierung verwendete Beschichtungsgerät konzipiert hatte. Sie beide haben mir den Laboralltag sehr erleichtert und mich durch fruchtbare Diskussionen und eine gehörige Portion Humor die ein oder andere Hürde nehmen lassen.

Nicht vergessen möchte ich die anderen Doktoranden unseres Teams Herrn Robert Witzenzellner, Herrn Robert Petzold und Herrn Andreas Moldan, die nicht nur dazu beigetragen haben, eine gute Laboratmosphäre zu schaffen, sondern auch bei Engpässen meine Zellen gefüttert haben.

Außerdem danke ich unseren Zivildienstleistenden der letzten Jahre dafür, dass sie mir viele kleine Dienste abgenommen haben, was mir viel Zeit erspart hat.

Last but not least bedanke ich mich bei meinem Mann Georg, der in der letzten Phase dieser Arbeit unermüdlich hinter mir stand, Korrektur gelesen hat und mich ermuntert hat, wenn ich einmal nicht weiter wusste.

# LEBENS LAUF

## 11. Lebenslauf

**Name:** Goldemund, geb. Dorfner

**Vorname:** Angelika

**Geburtsdatum:** 24.06.1968

**Geburtsort:** München

**Familienstand:** Verheiratet, ein Kind

**Schulbildung:**

09/74 – 08/76: St. Anna Grundschule, München

09/76 – 08/78: Führichschule, München

09/78 – 08/82: Städtisches Heinrich-Heine-Gymnasium, München

09/82 – 08/85: Städtische Wilhelm-Röntgen-Realschule, München

Abschluß 1985: Mittlere Reife

09/85 – 06/88: Städtisches Asam Gymnasium, München

Abschluß 1988: Abitur

**Hochschulstudium:**

11/88 – 10/89: Studium der Anglistik an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

11/89 – 02/96: Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Abschluß: Diplom (Note: 1,6)

**Diplomarbeit:**

02/95 – 11/95:

Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München, mit dem Titel: „*Importierbarkeit der zytoplasmatischen Uridylatkinase in Hefemitochondrien nach Einführung von Prolinresten durch in vitro Mutagenese*“

**Berufliche Tätigkeiten:**

11/95 – 12/95 und 05/96:

Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München

03/97 – 01/2000

Anstellung als Biologin im Klinikum Großhadern, Medizinische Klinik und Poliklinik III, im Bereich Knochenmark-/Stammzelltransplantation (Leitung: Prof. Dr. med. H-J. Kolb)

02/2000 – 03/2004:

Anstellung als Biologin im Klinikum Großhadern, Herzchirurgische Klinik, im Bereich Zellkultur/Tissue-Engineering (Leitung: Prof. Dr. med. B. Reichart)