ADAPTATION VON STATISCH KULTIVIERTEN ENDOTHELZELLEN AUF PU-PROTHESEN AN SCHERKRÄFTE IN VITRO

Robert Pätzold

München

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

Angefertigt unter der Leitung von
PD Dr. med. H. Gulbins

ADAPTATION VON STATISCH KULTIVIERTEN ENDOTHELZELLEN AUF PU-PROTHESEN AN SCHERKRÄFTE IN VITRO

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Robert Pätzold

Stuttgart

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Frau Prof. Dr. S. H. Däbritz
Mitberichterstatter:	Herrn Prof. Dr. M. Sperandio
	Herrn Prof Dr. M. Blumenstein
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2007

DANKSAGUNG

Besonderen Dank schulde ich Herrn PD Dr. Gulbins, der mich mit seinen Ideen und seiner Weitsicht in die Lage versetzt hat, diese Arbeit anzunehmen und zu verwirklichen. Er konnte Freude und Lust an der experimentellen Forschung so vermitteln, dass ich auch in schwierigen Phasen nicht den Glauben an den Erfolg der Arbeit verlor. Ich bedanke mich bei Herrn Prof Dr. Reichart, der als Leiter des Institutes für Herzchirurgie in Großhadern das herzchirurgische Zelllabor ins Leben rief, und die Forschung mit Gefäßzellen unter herzchirurgischen Aspekten ermöglicht, bei Frau Prof. Dr. Däbritz, die mich bei der Fertigstellung der Arbeit bis zum Einreichen beim Dekanat begleitete.
Viel zu verdanken habe ich auch den Mitarbeiterinnen des herzchirurgischen Zelllabors, ohne die so eine Arbeit nicht möglich wäre. Allen voran möchte ich mich bei Frau Uhlig bedanken, die durch ihre langjährige Erfahrung als MTA auf diesem Gebiet mit viel Geschick und Routine das Rückgrat des Labor ist, bei Frau Dr. Goldemund, die als Biologin mir die nötigen Handfertigkeiten im Umgang mit den Zellkulturen beibrachte und Frau Haas, die als MTA ihr enormes Geschick bei der Herstellung der schwierigen immunhistologischen Färbungen einbrachte. Auch möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeiterin und Zivildienstleistenden für das freundliche und angenehme Arbeitsklima bedanken.
Da die Arbeit viel Zeit zu unregelmäßigen Zeiten beanspruchte, war es nicht einfach, diese in Einklang mit dem Studium, mit der Arbeit und dem Freundeskreis zubekommen. Dass dies so unwahrscheinlich gut geklappt hat, verdanke ich allen rücksichtsvollen Hochschullehren wie Dr. Ückeberger.
Meine Freundin Eva war mir durch ihre Nachsicht und durch ihren Zuspruch in schwierigen Zeiten eine sehr große Stütze. Auch meinem Freundeskreis möchte ich hiermit für die andauernde Motivation danken.
Mein letzter und größter Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Ludwig und Brigitte Pätzold, die es mir ermöglicht haben zu studieren, so wie meinen beiden Geschwistern Matthias und Bernhard und meinen beiden Großmüttern, die mir so viel Kraft geben. Ihnen möchte ich die Arbeit widmen.

Inhaltsangabe

1.1Einleitung

1.2 Fragestellung und Zielsetzung

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur und Zellgewinnung

2.1.1 Allgemeine Bedingungen

2.1.2 Zellgewinnung aus der V. saphena magna

2.1.3 Endothelzellgewinnung

2.1.4 Fibroblastenzellgewinnung

2.1.4 Glatte Muskelzellgewinnung

2.1.5 Kultur der Zellen

2.1.6 Zellzahlbestimmung

2.2. Beschichtung

2.2.1 Beschichtungen von 18 mm PU-Grafts

2.2.1.1 Beschichtung von 18 mm PU Grafts mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen

2.2.1.2 Beschichtung von Fibroblasten auf 18 mm PU-Grafts

2.2.1.3 Beschichtung von Endothelzellen auf 18 mm PU-Grafts

2.2.2 Beschichtung von 4 mm PU-Grafts

2.2.2.1 Beschichtung von Fibroblasten und glatten Muskelzellen auf 4 mm PU-Grafts

2.2.2.2 Endothelbeschichtung der 4 mm PU-Grafts

2.2.3 4 mm PU-Graft und Patch Beschichtungen

2.2.3.1 Langzeitversuch der 4 mm PU-Grafts

2.2.3.2 Toxizitätsversuche von Ethylenoxid der 4 mm PU-Patches auf die Zellkulturen

2.2.3.2.1 Toxizität von Ethylenoxid auf Fibroblasten und glatten Muskelzellen ohne Spülung

2.2.3.2.2 Toxizität von Ethylenoxid auf Fibroblasten und Endothelzellen ohne Spülung

2.2.3.2.3 Toxizität von Ethylenoxid auf Fibroblasten und Endothelzellen nach Spülung

2.3 Perfusion

2.3.1 Perfusion von 18 mm PU-Grafts

2.3.2 Perfusion von 4 mm PU-Grafts

2.3.3 Bestimmung der Scherkraft („Shear Stress“)

2.3.4 Viskosität des Perfusionsmediums

2.4. Probenaufbereitung für das Rasterelektronenmikroskop (REM)

2.4.1. Fixierung

2.4.2. Aufsteigende Alkoholreihe

2.4.3. Kritisch-Punkt-Trocknen

2.4.4. Gold-Palladium Sputtern

2.4.5. Rasterelektronenmikroskopie

2.5 Vorbereitung der PU-Grafts für immunhistochemische Untersuchungen

2.5.1 Immunhistochemischer Nachweis vitaler humaner Zellen mittels Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper

2.5.2 Beurteilung der Ergebnisse der Immunhistologie

2.6 Verwendete Materialien

3. Ergebnisse

3.1 Zellgewinnung aus der Vena saphena magna

3.2 Beschichtungen

3.2.1 Beschichtungen von 18 mm PU-Grafts

3.2.1.1 Beschichtung der 18 mm PU- Grafts mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen

3.2.1.2 Beschichtung der 18 mm PU-Grafts mit Fibroblasten

3.2.1.3 Endothelbeschichtungen

3.2.2 Beschichtungen von 4 mm PU-Grafts

3.2.2.1 Fibroblasten- und glatte Muskelzellbeschichtung von 4 mm PU-Grafts

3.2.2.2 Endothelbeschichtung von allen 4 mm PU-Grafts

3.2.3 Beschichtung der 4 mm PU-Grafts und Patches

3.2.3.1 Langzeitversuch mit zwei 4 mm PU-Grafts

3.2.3.1.1 Verlauf des Langzeitversuchs mit 4 mm PU-Graft ohne Endothelbeschichtung

3.2.3.1.2 Verlauf des 4 mm PU-Graft Langzeitversuchs mit Endothelbeschichtung
3.2.3.2 Toxitätsuntersuchung mit Fibroblasten und mit glatten Muskelzellen auf SB 0070 Patches ohne Spülung
3.2.3.3 Vergleich von SB 0063 Patch und SB 0070 Patch ohne Spülung und nach 6 Stunden Spülung
3.2.3.3.1 Verlauf des Vergleichs zwischen SB 0070 und SB 0063 ohne Spülung
3.2.3.3.2 Verlauf des Vergleichs zwischen SB 0070 und SB 0063 nach 6 Stunden Spülung
3.3 Perfusionen
3.3.1.1 Status der 18 mm PU-Grafts vor der Perfusion
3.3.2.1 Status nach der Perfusion bei 0 Minuten Vorlauf
3.3.2.2 Status nach der Perfusion bei 15 Minuten Vorlauf
3.3.2.3 Status nach der Perfusion bei 30 Minuten Vorlauf
3.3.2.4 Status nach der Perfusion bei 45 Minuten Vorlauf
3.3.2.5 Status nach der Perfusion bei 60 Minuten Vorlauf
3.3.3 Perfusion von 4 mm PU-Graft
3.3.3.1.1 Status der 4 mm PU-Grafts SB 0070 vor der Perfusion
3.3.3.1.2 Status der 4 mm PU-Grafts SB 0063 vor der Perfusion
3.3.3.2.1 Status der 4 mm PU-Grafts SB 0070 nach der Perfusion
3.3.3.2.2 Status der 4 mm PU-Grafts SB 0063 nach der Perfusion
4. Diskussion
4.1 Zellgewinnung aus der Vena Saphena Magna
4.2 Beschichtung von PU-Grafts
4.2.1 Beschichtung von 4 mm PU-Grafts
4.2.2 Beschichtung von PU-Patches
4.2.3 Die Toxizität von Ethylenoxid für die beschichteten Zellkulturen
4.2.4 Beschichtung von 18 mm PU-Grafts
4.3 Perfusion und Adaptation der Endothelzellen an Scherkraft („Shear Stress“)
4.3.1 Einfluss der Vorlaufzeit auf die Adaptation der Zellkulturen an Scherkraft
4.3.2 Perfusion der 4 mm Graft SB 63 mit 30 Minuten Vorlauf
5. Zusammenfassung
6. Literaturverzeichnis

1.1 Einleitung

Die moderne rekonstruktive Gefäßchirurgie ist kaum älter als 50 Jahre, der erste femoro-popliteale Venen-Bypass mit einer körpereigenen Vene wurde 1948 von Jean Kunlin durchgeführt (autologer Gefäßersatz). Die meisten gefäßchirurgischen Bypässe bei kleineren Gefäßen werden heute noch mit körpereigenen Gefäßen durchgeführt. Man verwendet weiterhin Venen wie z.B. die Vena saphena magna für femoro-popliteale Bypässe oder auch Arterien wie A. thoracica interna in der Herzchirurgie für coronare Bypässe.

Seit den 60er Jahren werden auch zunehmend prothetische Gefäßersatzmaterialen wie Teflon, Dacron, PTFE entwickelt (alloplastischer Gefäßersatz), die heute hauptsächlich bei Rekonstruktionen im Bereich der Aorta und der Beckenarterien zum Einsatz kommen. Ihr Vorteil ist, dass man sie in allen beliebigen Formen, Größen und Mengen produzieren kann. Auch ist kein zusätzliches Trauma für die Gewinnung des Gefäßersatzes notwendig.

Der größte Nachteil an diesem alloplastischen Gefäßersatz ist die höhere Thrombogenität der Oberfläche im Vergleich zur physiologischen Gefäßinnenwand. Dabei kommt es in der Aorta und in den Beckengefäßen aufgrund der hohen Strömungsgeschwindigkeit des Blutes vergleichsweise selten zu thrombotischen Komplikationen. Im Bereich der Herzklappen, wo sehr unterschiedliche Strömungsverhältnisse herrschen, kann es schnell zu einer Thrombusbildung kommen, die im nächsten Pulsschlag als Embolie davon geschwemmt werden kann.

Es ist deshalb nötig durch eine lebenslange Therapie mit gerinnungshemmenden Medikamenten, Thrombosen und Embolien vorzubeugen. Diese Therapie birgt aber das Risiko einer Blutungskomplikation. Die Inzidenz lebensbedrohlicher Blutungskomplikationen unter einer gerinnungshemmenden Therapie ist altersabhängig und beträgt bei den unter 65 Jährigen 0.5% und steigt auf bis zu 1-2% bei älteren Patienten (*Arom et al., 1996*).

Die Idee, kleinlumige Gefäßprothesen mit Durchmessern von $\leq$ 4 mm, wie sie in der Herzchirurgie erforderlich sind, mit Hilfe einer gerinnungshemmenden Therapie vor einem drohenden thrombotischen Verschluss zu bewahren, scheitert an der hohen Thrombogenität. Dies beruht hauptsächlich darauf, dass bei einem geringen Blutfluss über eine große Oberfläche eine lange Zeit Kontakt zwischen dem Blut und der künstlichen Oberfläche besteht.

Seit Ende der 80er Jahre wird versucht, bei künstlichen Oberflächen die Biokompatibilität zu erhöhen, die Thrombogenität zu vermindern und die Immunreaktionen auf biologischen Materialien zu verhindern, in dem künstliche oder biologische Gefäßprothesen mit körper-

eigenen Endothelzellen beschichtet werden. Viele Arbeitsgruppen verwendeten Proteine aus der Basalmembran als eine Art Klebstoff, um die Anhaftung der Endothelzellen auf den künstlichen Untergrund zu verbessern (*Kadletz et al., 1987; Kent et al., 1992; Vohra et al., 1990; Kirkpatrick et al., 1990; Lee et al., 1993*). Die Besiedelungen mit dieser Methode zeigten bald schon gute Ergebnisse. Aber die so besiedelten Endothelzellen lösten sich in den ersten Minuten wieder von den künstlichen Gefäßprothesen ab, wenn sie Scherkräften (Shear Stress) ausgesetzt wurden (*Giudiceandrea et al., 1998*). Es ist davon auszugehen, dass die Endothelzellen während ihrer doch relativ langen Kultivierungsphase die Widerstandsfähigkeit gegenüber der Scherkraft (Shear Stress) verloren hatten (*Kaiser et al., 1999*).

In unserer Arbeitsgruppe wurde versucht, die Anhaftung der Endothelzellen auf den künstlichen oder biologischen Oberflächen durch eine Grundlage aus Fibroblasten und glatten Muskelzellen, die zusammen mit den Endothelzellen eine natürliche Basalmembran bilden sollten, zu verbessern. Hierzu wurden in Vorversuchen die Zellgewinnung von Endothelzellen, Fibroblasten und Glattenmuskelzellen aus der Vena saphena magna etabliert. Auch konnte die Zellbesiedlung von verschieden großen PU-Grafts erfolgreich durchgeführt werden. Dies konnte auch für Schweineherzklappen und einem Homograft gezeigt werden (*Gulbins et al., 2003a; Gulbins et al., 2003b*).

1.2 Fragestellung und Zielsetzung

Für den Einsatz der so beschichteten Polyurethanprothesen (PU-Grafts) und Herzklappen in der Praxis stellte sich die Frage, wie man den Verlust der Widerstandsfähigkeit der Endothelzellen gegen die Scherkraft auf eine einfache Art und Weise vermeiden kann. In der Literatur wurde bei allen Perfusionsversuchen beschrieben, dass sich dieser Verlust in den ersten Minuten abspielte, und dass immer nur wenige Endothelzellen haften blieben (*Giudiceandrea et al., 1998*). Unsere Idee war, dass es möglich sein müsste, die Endothelzellen statisch zu kultivieren und damit den PU-Graft zu besiedeln, Veränderungen der Endothelzellen somit in Kauf zu nehmen, und sie dann wieder in einer möglichst kurzen Zeit an die Scherkraft zu readaptieren.

Um herauszufinden wieviel Zeit statisch kultivierte und besiedelte Endothelzellen für die Readaptation an Scherkräfte brauchen, mussten Zwischenschritte definiert werden:

- Eine ausreichend starke Besiedelung der PU-Grafts mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen, um Endothelzellen eine möglichst konfluente und fest verankerte Oberfläche zur Ansiedlung bieten zu können.
- Entwicklung eines Perfusionskreislaufs, der unter konstanten, sterilen Bedingungen über mehrere Stunden einen exakt zu steuernden pulsatilen Fluss erzeugen konnte.
- Die Klärung der Frage, welche Bedeutung das Sterilisationsverfahrens mit Gammastrahlen oder mit Ethylenoxid auf die Besiedelung von PU-Grafts hat.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur und Zellgewinnung

2.1.1 Allgemeine Bedingungen

Alle Arbeitsschritte im offenen System wurden an einer sterilen Werkbank (Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau) durchgeführt. Die Brutschrankbedingungen (Hereus 6000 und Hera Cell, ebenfalls Kendro) waren konstant bei 37°C, 5 % CO_2 -Begasung und 95% Luftfeuchtigkeit. Zentrifugiert wurde, wenn nicht anders angegeben, für 10 Minuten bei 4°C, 1100 U/min (250g) und leichter Bremse.

2.1.2 Zellgewinnung aus der V. saphena magna

Die Zellen wurden wie in der Literatur (*Kann et al., 1985; Terramani et al., 2000; Haegerstrand et al., 1992; Fischlein et al., 1994; Fischlein et al., 1996*) beschrieben, gewonnen und kultiviert. Es gab kleinere Modifikationen entsprechend unseren Bedürfnissen und dem verwendeten Material. Es wurden Venenstücke der V. saphena magna verwendet, die bei aorto-koronaren Bypass Operationen übrig blieben. Die örtliche Ethikkommission war von der anonymisierten Verwendung dieser Venen informiert worden. Die Patienten, durchschnittlich 71 Jahre alt, gaben ihr Einverständnis zur Nutzung des Materials für die Zellgewinnung zu wissenschaftlichen Zwecken. Die Venenstücke zwischen 5,5 und 24 cm lang, wurden steril in ein Gefäß mit M199 (IV) gelegt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Nach 0-3 Tagen (Durchschnitt 2 Tage) postoperativ wurden die Venen im Zelllabor verarbeitet.

Zuerst wurde ein kleines Stück Vene von ca. 1,5 cm Länge für die Präparation der glatten Muskelzellen abgeschnitten und zurück in M 199 (IV) gelegt. Nicht verschlossene Venenabgänge und offensichtliche Leckagen ligierte man mit einem sterilen Faden (Supolene 4-0; Resorba Nürnberg). An beiden Enden der Vene befestigte man eine Gefäßkanüle (Medtronic USA) mit einem Dreiwegehahn (Discofix; Braun Melsungen AG). Zunächst wurde die Vene durch Instillation mit einem 37°C warmen Spülmedium (V) auf Dichtigkeit geprüft, und dann mit ca. 20ml des restlichen Spülmediums von Rückständen der OP gereinigt.

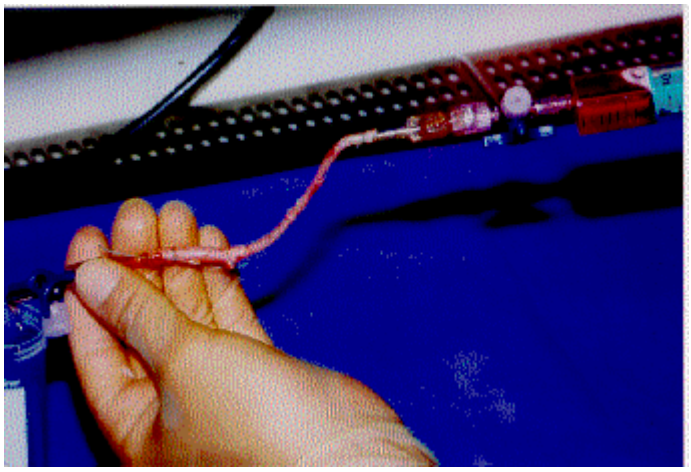


Abbildung 1: Die kanulierte Vene bei der Dichtigkeitsprüfung mit dem Spülmedium

Die jetzt folgende Zellgewinnung wurde in ähnlicher Form schon früher beschrieben. (*Deutsch et al., 1997; Fischlein et al., 1994; Heagerstrand et a., 1992; Johnson et al., 1997; Sharefkin et al., 1990 ; Zilla et al., 1990*)

2.1.3 Endothelzellgewinnung

Nach dem Spülen wurde die Vene mit einer Collagenase II-Lösung gefüllt. Zur Herstellung löste man die Collagenase (VII) in PBS (VIII) unter Zusatz von 1% Humanalbumin bei 37°C und filtrierte (0,2 µm) es anschließend steril. Die Vene wurde luftfrei befüllt, und die Venenwand prall gespannt war. Danach wurde die Vene in einen sterilen Becher mit 37°C warmen PBS gegeben und im Brutschrank über 20 Min. bei 5% CO_2 und 37°C inkubiert. Die Collagenasereaktion stoppte man mit 20 ml Stoppmedium (VI) bei Raumtemperatur. Dabei wurden die gelösten Zellen in ein steriles Gefäß gespült und die so entstandene Zellsuspension anschließend 10 min bei 1100 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde mit 3 ml Endothelzellmedium (III) resuspendiert und als Zelllösung in eine Zellkulturflasche (25cm², Corning USA) gegeben, die schon mit 3ml Endothelzellmedium gefüllt war. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2.

2.1.4 Fibroblastenzellgewinnung

Wie bei der Endothelzellgewinnung wurde die Vene erneut mit der Collagenase II-Lösung (IX) befüllt, in einen Becher mit PBS gelegt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 über 30 Minuten inkubiert. Das Stoppmedium (VI) beendete die Collagenasereaktion. Die Zellsuspension aus der Collagenaselösung und dem Stoppmedium spülte man aus der Vene in

ein steriles Röhrchen und zentrifugierte dies bei 1100 U/min bei 4°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgeschöpft und das Zell-Pellet mit 1,5 ml Fibroblastenmedium (I) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (25cm², Corning USA) pipettiert, in der sich 1,5 ml Fibroblastenmedium befanden. Diesen Vorgang wiederholte man insgesamt 3-mal und gab die Zellsuspension jedes Mal in dieselbe Zellkulturflasche, so dass am Ende 6 ml Zellsuspension in der Zellkulturflasche waren. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 kultiviert.

2.1.4 Glatte Muskelzellgewinnung

Das Venenstück von ca.1,5 cm Länge, welches noch im Kühlschrank lagerte, wurde auf 2 Petrischalen (X) mit Skalpellen (No° 20, Feather Japan) und Pinzetten steril präpariert. Die Schichten der Adventitia und Intima konnten durch vorsichtiges Schaben mit den Skalpellen entfernt werden. Der dünne Muskelzell-Layer wurde in sehr kleine Stücke geschnitten und auf einer Petrischale (X) mit einer sterilen Kompresse und einem Teflonring, der die Muskelstücke auf den Boden drückte, befestigt. Im späteren Verlauf der Studie drückte man die Zellstücke mit Deckgläsern (24x24 mm Roth, Karlsruhe), die mit steriler Vaseline am Boden hafteten, auf den Boden der Petrischale. Anschließend erhielten die Muskelzellstücke als Kulturmedium Smooth Muscle Cell Growth Medium (SGM) (II). Insgesamt 4 Schalen mit Muskelzellstücken wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 kultiviert, bis genügend Muskelzellen aus den Venenstücken ausgesprosst waren. Dann konnte man vorsichtig die Muskelzellstücke, die Kompressen und die Deckgläser entfernen. Der ausgesprosste Muskelzell-Layer wurde trypsiniert und auf eine kleine Zellkulturflasche gesetzt.

2.1.5 Kultur der Zellen

Die Zellkulturen wurden regelmäßig in den Zellkulturflaschen mit einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axiovert 35) beobachtet und auf ihre Morphologie und ihr Wachstum hin beurteilt. Dreimal pro Woche, am Montag, Mittwoch und Freitag, wurde das Medium gewechselt. Die Endothelzellkulturen bekamen Endothelial Cell Growth Medium (III), die Fibroblastenkulturen Fibroblast Growth Medium (I) und die glatte Muskelzellkulturen Smooth Muscle Cell Growth Medium (SGM)(II).

Sobald die Endothelzellen einen konfluenten Zell-Layer auf dem Flaschenboden gebildet hatten, wurden sie auf die nächste Passage umgesetzt. Dabei wurde zuerst das alte Medium abpipettiert, mit PBS (VIII) nachgespült und dann Trypsin (Trypsin EDTA; Invitrogen) hinzu- gegeben und dieses 120 Sekunden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert. Unter

dem Mikroskop wurde sichergestellt, ob sich alle Zellen vom Boden gelöst hatten. Die Trypsin-Reaktion stoppte man durch die Zugabe des Endothelzellmediums (III). Diese Zellsuspension aus Trypsin, dem Zellmedium und den Zellen wurde bei 1100 U/min bei 4°C über 10 Minuten zentrifugiert, das entstandene Zell-Pellet in Endothelzellmedium resuspendiert und auf die nächste Flaschengröße gebracht (75 cm², 162 cm², Corning USA). Die Endothelzellen einer konfluenten großen Flasche wurden auf drei große Flaschen (162 cm²) verteilt.

Die Fibroblasten und die Muskelzellen setzte man bereits im präkonfluenten Stadium um. Das Medium wurde abpipettiert, dann zweimal 60 Sekunden lang mit PBS (VIII) gespült. Wie oben bei den Endothelzellen beschrieben wurde das Trypsin hinzugegeben, inkubiert, gestoppt, zentrifugiert, resuspendiert und auf die nächste Flaschengröße gebracht. Nur bei der Aufteilung einer präkonfluenten großen Flasche (162 cm²) wurde die Zellsuspension auf zwei Flaschen aufgeteilt.

Dieses Verfahren konnte für die meisten Kulturen bis auf Passage 7 durchgeführt werden, was fast immer eine ausreichende Anzahl Zellen in guter Qualität erbrachte.

2.1.6 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde 30 µl der Zellsuspension mit 30 µl Trypan-Blau (0,4%; Sigma USA) angefärbt, in der Neubauer-Zählkammer nach lebenden und toten Zellen ausgezählt und nach der Formel auf die Zellkultur hochgerechnet.

$$Z.z. = \frac{x}{8} \cdot a \cdot y \cdot 10000$$

Z.z. = Zellzahl
x = gezählte Zellen in den 8 Quadranten
a = Verdünnungsfaktor beim Anfärben der Zellen
y = Zellsuspension in ml

2.2. Beschichtung

Es wurden zwei verschieden große PU-Grafts mit Zellen besiedelt, was zwei unterschiedliche Techniken erfordert.

2.2.1 Beschichtungen von 18 mm PU-Grafts

Zur Zellbesiedelung wurde ein Gerät entwickelt, das durch Bewegung die Besiedlung des PU-Grafts in allen drei Dimensionen erlaubte. Das Gerät bestand aus einer regulierbaren Antriebseinheit, einem Beschichtungszylinder mit 110ml Füllvolumen und einem Inlay.

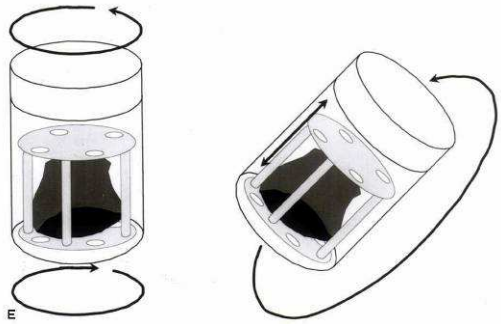
A B 

Abbildung 2 A/B: A: Der Beschichtungszylinder auf dem Rotationsgerät. B: Zeigt die drei Freiheitsgrade des Inlays im Beschichtungszylinder.

Das Inlay aus Teflon war so konstruiert, dass man den PU-Graft mit 8 Fäden befestigen konnte. Es war 2 cm kürzer als die Innenlänge des Zylinders. Bei einer Drehung von 180° um die Längsachse verrutschten das Inlay und der PU-Graft durch die Schwerkraft im Zylinder und durchmischten dadurch die Zellsuspension. Die Rotationsebene des Gerätes stand im 45° Winkel zur Horizontalen und der Zylinder wurde über eine Lauffläche am Boden um seine eigene Achse gerollt. Dies ermöglichte, dass an jedem Punkt des PU-Grafts, sowohl innen als auch außen, sich alle noch nicht anhaftenden Zellen absetzten konnten. Das Gerät rotierte 37 Sekunden lang, daran schloss sich eine Ruhephase von 30 Minuten an.

2.2.1.1 Beschichtung von 18 mm PU-Grafts mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen

Zur Beschichtung wurde ein ca. 5 cm langer PU-Graft in das Inlay eingenäht und in den Zylinder eingebracht. Dieser war mit einer Mischung aus Fibroblastenmedium (I) und SGM (II) zu ⅔ gefüllt. Dann wurde die Zellsuspension aus glatten Muskelzellen und Fibroblasten (siehe 2.1.5; *typsinieren der Zellkulturen*) hinzugegeben. Über einen Dreiwegehahn am

Deckel des Zylinders war es möglich mit einer 20 ml Spritze den Zylinder luftfrei zu befüllen. Die Anzahl der Zellen für die Beschichtung lag im Durchschnitt bei 31×10^6 ($\pm 10 \times 10^6$).
Die Besiedelung erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2. Nach 24 Stunden wurde eine Probe vom Rand des PU-Grafts genommen, um den Erfolg zu kontrollieren. Das Zellmedium aus dem Zylinder wurde zentrifugiert und die Zellen in der Neubauerzählkammer ausgezählt, um die Zahl der adhärenten Zellen auf dem PU-Graft zu bestimmen. Das Beschichtungsergebnis lag bei 32×10^6 ($\pm 9 \times 10^6$) Zellen, was einer durchschnittlichen Beschichtung von $1{,}1 \times 10^6$ ($\pm 0{,}6 \times 10^6$) Zellen pro cm² entsprach. Nach der Beschichtung blieb das Inlay mit dem PU-Graft für 6 Tage in einem speziell angefertigten Glaszylinder mit einem Gemisch aus Fibroblastenmedium (I) und SGM (II) zu gleichen Teilen. Das Medium wurde alle 2 Tage ausgetauscht.

2.2.1.2 Beschichtung von Fibroblasten auf 18 mm PU-Grafts

Da nur für sechs der fünfzehn Grafts genügend glatte Muskelzellen vorhanden waren, wurden neun nur mit Fibroblasten beschichtet. Das Vorgehen war analog zur Fibroblasten- und glatte Muskelzellbeschichtung. Das durchschnittliche Alter der Zellkulturen lag bei 41 (± 20) Tagen und die Passage betrug 5,5 ($\pm 1{,}5$). Die 18 mm PU-Grafts wurden in 24 Stunden mit $26{,}6 \times 10^6$ ($\pm 13 \times 10^6$) Fibroblasten im Beschichtungszylinder beschichtet, was einer durchschnittlichen Beschichtung von $0{,}95 \times 10^6$ ($\pm 0{,}5 \times 10^6$) Zellen pro cm² entsprach.

2.2.1.3 Beschichtung von Endothelzellen auf 18 mm PU-Grafts

Nach 6 ($\pm 1{,}5$) Tagen wurde eine Probe vom Rand entnommen, um zu kontrollieren, ob sich ein ausreichender Fibroblastenzellteppich als Basis für die Endothelzellbeschichtung gebildet hat.
Danach kam das Inlay mit dem PU-Graft wieder in den Beschichtungszylinder, der mit Endothelmedium (III) und Endothelzellsuspension luftfrei befüllt war. Die Endothelzellkulturen waren 47 (± 20) Tage alt und auf Passage 7,75 (± 3). Innerhalb von 24 Stunden im Beschichtungszylinder wurden die 18 mm PU-Grafts mit $56{,}4 \times 10^6$ ($\pm 30 \times 10^6$) Endothelzellen besiedelt.
Die Besiedelung erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO_2, mit einer Rotationsphase von 37 Sekunden und einer anschließenden Ruhephase von 30 Minuten.
Nach der Besiedelung wurde eine Probe vom Rand entnommen und die Zellen aus dem Überstand mit der Neubauerzählkammer ausgezählt. Im Ergebnis waren die 18 mm PU-Grafts

mit $51{,}5 \times 10^6$ ($\pm 30 \times 10^6$) Endothelzellen besiedelt worden, was einer Beschichtung von $1{,}82 \times 10^6$ ($\pm 1{,}2 \times 10^6$) Zellen pro cm² entspricht.
Nach der Beschichtung kam der PU-Graft wieder in den Glaszylinder mit Endothelmedium (III). Das Endothelzellmedium (III) wurde alle zwei Tage ausgetauscht.

2.2.2 Beschichtung von 4 mm PU-Grafts

Es wurden insgesamt acht 4 mm PU-Grafts beschichtet, die später perfundiert wurden. Es gab 2 Chargen von 4 mm PU-Grafts. Die Charge SB 0063 wurde mit Gammastrahlen, die Charge SB 0070 mit Ethylenoxidgas sterilisiert. Die Grafts waren bei der ersten Beschichtung 5 cm lang.
Da die 4 mm PU-Grafts einen sehr kleinen Durchmesser hatten und nur eine kleine Oberfläche im Inneren besiedelt werden sollte, war es nicht notwendig ein Gerät zu benutzen, welches in allen 3 Ebenen beschichtete. Das Beschichtungsgerät bestand aus einer Antriebseinheit, einem Beschichtungszylinder mit 110 ml Füllvolumen und einem Inlay. Der Beschichtungszylinder wurde um eine horizontale Achse gedreht. Der Durchmesser des Inlays war so groß, dass es sich bei der Rotation mitdrehte.

2.2.2.1 Beschichtung von Fibroblasten und glatten Muskelzellen auf 4 mm PU-Grafts

Für die Beschichtung wurde ein 5 cm langer 4 mm PU-Graft mit 4 Fäden an dem Inlay in Längsrichtung befestigt, ein Ende wurde von einem Teflonstöpsel, mit einem Durchmesser von 4 mm verschlossen.
Die Zellkulturen, mit denen die 4 mm PU-Grafts beschichtet wurden, waren 34 (± 8)Tage alt. Die glatten Muskelzellen waren auf Passage 4, die Fibroblasten auf Passage 5 (± 1). Das Ergebnis war eine Beschichtung von 1.3×10^6 ($\pm 1 \times 10^6$) Zellen pro cm².
Das Zell-Pellet aus Fibroblasten und den glatten Muskelzellen wurde in 2 ml eines Mediums, dass zu gleichen Teilen aus Fibroblastenmedium (I) und SGM (II) bestand, resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde über eine Spritze mit einer Kanüle 0.9 x 70 mm am unteren Ende in den 4 mm PU-Graft eingespritzt. Es war darauf zu achten, dass sich keine Luft mehr in dem Graft befand. Nachdem der 4 mm PU-Graft mit der Zellsuspension befüllt war, wurde er von oben mit einem zweiten Teflonstöpsel verschlossen.
Das Inlay mit dem 4 mm PU-Graft wurde in den Beschichtungszylinder gegeben und dieser mit ½ Fibroblastenmedium(I) und ½ SGM (II) aufgefüllt. Der geschlossene Beschichtungszylinder wurde mit seinem Deckel an der horizontal stehenden Achse des

Antriebes befestigt und für 2 Stunden in den Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 gestellt und alle 15 Minuten 405° um die Längsache gedreht.
Nach 2 Stunden entfernte man beide Teflonstöpsel vom Graft. Das Inlay mit dem 4 mm PU-Graft wurde in einem speziell angefertigten Glaszylinder mit ½ Fibroblastenmedium (I) und ½ SGM (II) im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 versorgt. Das Medium wurde alle 2 Tage ausgetauscht. 4 ($\pm$ 1) Tage nach der Beschichtung entnahm man eine Probe vom Rand.

2.2.2.2 Endothelbeschichtung der 4 mm PU-Grafts

Diese Endothelzellkulturen waren 41,2 ($\pm$ 7) Tage alt und auf Passage 7 ($\pm$ 1). Im Ergebnis konnten $2{,}2 \times 10^6$ ($\pm\ 1{,}5 \times 10^6$) Zellen pro cm² auf die 4 mm PU-Grafts beschichtet werden.
Die zu beschichtenden Endothelzellen resuspendierte man in 1 ml Endothelzellmedium (III), zog sie in eine Spritze auf und füllte sie langsam von unten in den 4 mm PU-Graft ein. Sobald die Zellsuspension oben ankam, verschloss man den 4 mm PU-Graft mit dem Teflonstöpsel. Diese Methode hatte den Vorteil, dass man die Fibroblasten und glatte Muskelzellen nicht durch eine lange Kanüle traumatisierte.
Das Inlay mit dem Graft kam in den Beschichtungszylinder, dieser wurde mit Endothelmedium aufgefüllt, verschlossen und an dem Rotationsgerät befestigt. Alle 15 Minuten drehte sich der Beschichtungszylinder 405° um die Längsachse im Brutschrank bei 37°C 5% CO_2. Nach 2 Stunden entfernte man beide Teflonstöpsel vom 4 mm PU-Graft und versorgte dieses im Glaszylinder mit Endothelmedium (III) im Brutschrank bei 37°C 5% CO_2. Das Medium wurde alle 2 Tage ausgetauscht.

2.2.3 4 mm PU-Graft und Patch Beschichtungen

Insgesamt acht 4 mm PU-Grafts wurden unter verschiedenen Aspekten beschichtet.
In einem Vorversuch beobachtete man das Zellwachstum im Inneren der Röhre an zwei beschichteten 4 mm PU-Grafts über mehrere Wochen.
An sechs 4 mm PU-Grafts wurde untersucht, ob sich die Toxizität des Gas Ethylenoxid, mit dem die Charge SB 0070 sterilisiert war, auf das Wachstum der Fibroblasten und glatte Muskelzellen auswirkt. Dabei wurden die Chargen SB 0063 (Gammastrahlen sterilisiert) und Chargen SB 0070 (mit dem Gas Ethylenoxid sterilisiert) verglichen.

2.2.3.1 Langzeitversuch der 4 mm PU-Grafts

Zwei Röhren der Charge SB 0063 wurden vor der Beschichtung 30 Minuten im Fibroblastenmedium (I) und im SGM (II) gespült. Die Beschichtung erfolgte wie unter 2.2.2.1 beschrieben mit $1{,}6 \times 10^6$ und $2{,}4 \times 10^6$ Zellen/cm² von Fibroblasten und glatte Muskelzellen. Nach 5 Tagen wurde eine Röhre mit $1{,}8 \times 10^6$ Endothelzellen/cm² wie unter 2.2.2.2 beschrieben beschichtet.

2.2.3.2 Toxizitätsversuche von Ethylenoxid der 4 mm PU-Patches auf die Zellkulturen

Für die Toxizitätsversuche teilte man 4 mm PU-Grafts längs in zwei Hälften, je eine Hälfte wurde mit steriler Vaseline auf einer Petrischale befestigt. In die konkave Seite gab man das resuspendierte Zellpellet und inkubierte es 1 Stunde im Brutschrank, so dass sich die Zellen setzen konnten. Anschließend gab man das entsprechende Medium für die weitere Inkubation hinzu. Diese Vorgänge waren für die Fibroblasten, glatten Muskelzellen und die Endothelbeschichtung gleich.

2.2.3.2.1 Toxizität von Ethylenoxid auf Fibroblasten und glatten Muskelzellen ohne Spülung

Zwei 4 mm PU-Grafts von der Charge SB 0070, die mit dem Gas Ethylenoxid sterilisiert worden waren, beschichtete man wie unter 2.3.2 beschrieben, einmal mit 1×10^6 Fibroblasten und einmal mit 1×10^6 glatten Muskelzellen. Die Grafts wurden vor der Beschichtung nicht mit dem Medium gespült.

2.2.3.2.2 Toxizität von Ethylenoxid auf Fibroblasten und Endothelzellen ohne Spülung

Hier ging es um den direkten Vergleich der beiden Sterilisationsverfahren ohne Spülung. Je ein 4 mm PU-Graft der Charge SB 0070 (Gassterilisation) und der Charge SB 0063 (Gammastrahlensterilisation) wurden, wie unter 2.2.3.2 beschrieben, mit einer identischen Zellkultur beschichtet. Die Fibroblastenbeschichtung erfolgte mit jeweils $1{,}2 \times 10^6$ Zellen, die Endothelbeschichtung mit jeweils $1{,}2 \times 10^6$ Zellen. Für die Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop entnahm man am 6. und am 13. Tag nach Fibroblastenbeschichtung Proben.

2.2.3.2.3 Toxizität von Ethylenoxid auf Fibroblasten und Endothelzellen nach Spülen

Beide Proben wurden vor der Beschichtung im Fibroblastenmedium (I) 6 Stunden lang gespült. Je ein 4 mm PU-Patch der Charge SB 0070 (Gassterilisation) und der Charge SB 0063 (Gammastrahlensterilisation) beschichtete man wie unter 2.2.3.2 beschrieben mit einer identischen Zellkultur. Die Fibroblastenbeschichtung erfolgte mit jeweils $0{,}3 \times 10^6$ Zellen, die Endothelzellen wurden am 7. Tag mit jeweils $0{,}5 \times 10^6$ Zellen beschichtet. Proben entnahm man am 7. und am 14. Tag nach Fibroblastenbeschichtung zur Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop.

2.3 Perfusion

Um die Auswirkungen der Scherkraft auf den Zell-Layer des beschichteten PU-Grafts zu testen, musste eine Vorrichtung konstruiert werden, in der man den Durchfluss und Druck wie in vivo erzeugen konnte.
Die beschichteten PU-Grafts wurden auf beiden Seiten in Gefäßprothesen (XI) eingenäht. Als Perfusionsmedium diente Endothelmedium (III).
Der Hauptfluss wurde durch eine große Rollerpumpe (Stöckert München) erzeugt, die in unserer Laborwerkstätte mit einem Frequenzgeber modifiziert worden war. Dadurch konnte ein pulsatiler Durchfluss erzeugt werden. Um einen konstanten Mindestdruck (diastolischer Druck) und genügend Rückfluss für die große Rollerpumpe zu gewährleisten, wurde ein Reservoir eingebaut, welches in einer Höhe von ca. 60- 80 cm über der Perfusionskammer befestigt wurde. Das entsprach in etwa einem Mindestdruck von 40- 60 mmHg in der Perfusionskammer. Der Membran-Oxigenator (Medtronic USA) sicherte eine konstante Temperatur von 36°C-37°C und die Anreicherung des Mediums mit Sauerstoff.
Der Druck während der Perfusion wurde an 3 Punkten vor, hinter und in der Perfusionskammer gemessen und (über Siemens S300) in einer Druckverlaufskurve abgebildet. Die Verbindungsschläuche und das Reservoir stammten von einem Herzlungenmaschinenset (Medtronic USA). Die Perfusionskammer bestand aus Plexiglas und hatte an ihrer Längsseite zwei doppelseitige Stutzen aus Teflon, an denen man außen die Verbindungsschläuche und innen die Gefäßprothesen befestigen konnte. Der Deckel konnte mit 12 Imbusschrauben geschlossen werden und hatte zum Entlüften und zur Druckmessung eine Öffnung für einen Dreiwegehahn.
Eine weitere kleine Rollerpumpe, die als Bypass um die Perfusionskammer diente, ermöglichte es, den Durchfluss so zu verändern, dass eine Herzklappe mit einem kontinuierlichen Klappenschluss perfundiert werden konnte. Vor der Klappe wurde ein diastolischer Druck von ca. 0 - 30 mmHg erzeugt und über der Klappe ein diastolischer Druck von ca. 60-80 mmHg, was zu einem Klappenschluss führte. Um den Klappenschluss dokumentieren zu können wurde durch einen T-Konektor und einen 5 mm Port eine 5 mm 0° Optik (Storz, Tuttlingen) eingeführt und vor der Klappe platziert. Die Optik war mit einer Kamera und einer Lichtquelle (beides Storz, Tuttlingen) ausgestattet, die es ermöglichte, die Versuche auf Video anzuschauen und zu dokumentieren.

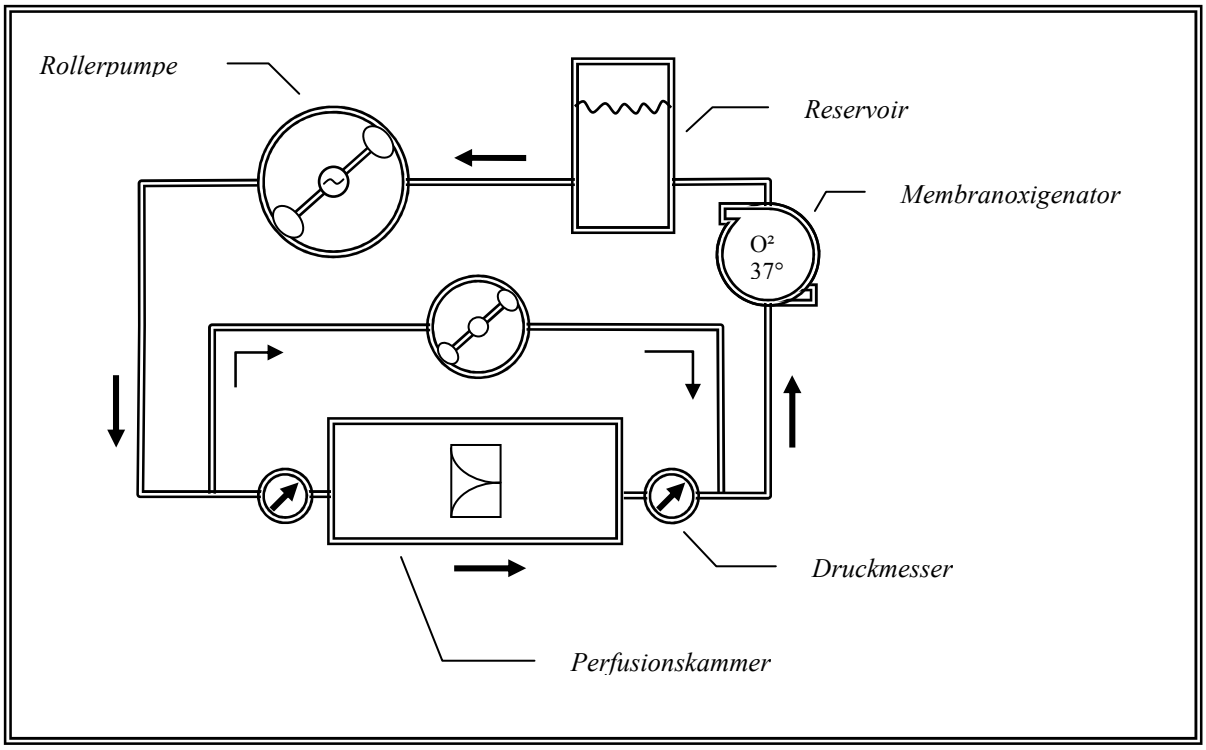


Abbildung 3: Schematische Zeichnung des Perfusionssystems. Die große Pumpe mit Frequenzgeber, rechts davon das Reservoir, gefolgt von dem Membranoxigenator. Um die Perfusionskammer am unteren Ende der Zeichnung sind zwei Druckabnehmer und eine Pumpe für den Bypass zum Klappenschluß zu sehen.

2.3.1 Perfusion von 18 mm PU-Grafts

Vor der Perfusion wurden beim Einnähen der 18 mm PU-Grafts in die Gefäßprothesen noch einmal Proben für das Rasterelektronenmikroskop und die Immunhistologie genommen. Die Perfusion der beschichteten 18 mm PU-Grafts wurde durchschnittlich 14,25 Tage (5-37 Tage) nach Beginn der Fibroblastenbeschichtung durchgeführt. Die 18 mm PU-Grafts mit einer Länge von 4 cm wurden End zu End mit den Gefäßprothesen (XI) anastomosiert und spannungsfrei in der Perfusionskammer befestigt. Die beiden Enden der Gefäßprothesen stülpte man über die Teflonstutzen der Perfusionskammer und befestigte diese mit sterilisierten Kabelbindern. Danach wurde die Perfusionskammer an den Perfusionskreislauf angeschlossen, mit Endothelmedium befüllt und verschlossen.

Das Ziel eines jeden Versuchs war es, einen Durchfluss von 0,5 $^{\text{Liter}}/_{\text{Minute}}$ bei einem Druck von 80-140 mmHg und einer Frequenz von 72 $^{1}/_{\text{Min.}}$ zu erreichen. Die Versuche unterschieden sich darin, in welcher Zeit (Vorlauf) der Druck und der Durchfluss erreicht werden sollte. Man unterschied Vorlaufzeiten von 0, 15, 30, 45, 60 Minuten. Die vorgegebenen Bedingungen wurden über 2 Stunden Versuchsdauer eingehalten.

Nach der Perfusion schnitt man den 18 mm PU-Graft aus den Gefäßprothesen heraus und entnahm Proben zur Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop und zur Färbung für immunhistochemische Nachweise. Dabei wurden Antikörper gegen Faktor VIII, Collagen IV, eNOS und CD31 verwendet.

2.3.2 Perfusion von 4 mm PU-Grafts

Die 4 mm PU-Grafts beschichtete man wie unter (2.2.2) beschrieben mit Fibroblasten und Endothelzellen. Durchschnittlich 11,6 Tage nach Beginn der Fibroblastenbeschichtung wurden Proben entnommen. Die Gefäßprothesen (XI) wurden endständig verschlossen und über ein Loch in der Gefäßprothesenwand mit den 4 mm PU-Grafts Seit zu End anastomosiert. Die Verbindung Gefäßprothese – PU-Graft befestigte man spannungsfrei in der Perfusionskammer mit sterilen Kabelbindern. Ziel war eine Frequenz von 72 $^{1}/_{\text{Min.}}$, ein Druck von 80-140 mmHg und eine Dauer von 2 Stunden einschließlich 30 Minuten Vorlaufzeit. Die Proben wurden unmittelbar nach der Perfusion entnommen und für eine Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop und für immunhistochemische Nachweise vorbereitet. Dabei setzte man Antikörper gegen Faktor VIII, Collagen IV, eNOS und CD31 ein.

2.3.3 Bestimmung der Scherkraft („Shear Stress“)

Scherkräfte entstehen durch Reibung einer fließenden Flüssigkeit an einer Oberfläche. Seine Bestimmung ist wichtig, um vergleichbare Werte zu bekommen für die Kraft, der die Zellen auf dem PU-Graft während des Durchflusses ausgesetzt sind.

Für den Perfusionsversuch wurde eine laminare Rohrströmung mit einer Renoldszahl ≤ 2000 angenommen. Der laminaren Rohrströmung liegt ein parabolisches V-Profil zugrunde mit V_{max} in der Mitte der Röhre und $V_0 = 0$ an der Wand. Durch die Reibung der unterschiedlich schnellen Moleküle der Flüssigkeit aneinander wird Kraft in Wärme umgesetzt. Die Summe der Kraft, die durch Reibung in Wärme umgesetzt wird, ist gleich der Kraft, die für eine Bewegung einer Flüssigkeit über eine Oberfläche, zum Beispiel eine Röhre benötigt wird. Mit dem Gesetz von Hagen- Poiseuille ist es möglich die Kräfte zu berechnen, die an der Wand, auf den Zellen und an der Röhre wirken.

Die Scherkraft ist die Kraft, die tangential als Schubspannung auf die Wand, in diesem Fall auf die beschichteten Zellen wirkt, wenn eine Flüssigkeit vorbeifließt. Man kann also sagen Scherkraft ist Kraft durch Fläche!

$$\tau = \frac{F}{A}$$

τ = Scherkraft

F = Kraft an der Röhrenwand

A = Fläche der inneren Röhrenwand

Die Kraft an der Röhrenwand für laminaren Fluss lässt sich aus dem Gesetz von Hagen-Poiseuille herleiten

$$F = \frac{8 \cdot \eta \cdot l}{r^2} \cdot \dot{V}$$

F = Kraft an der Röhrenwand

η = dynamische Viskosität bei 37°C

l = Länge der Röhre

$\dot{V}$ = Volumen pro Sekunde

r = Radius der Röhre

Die Fläche eines Zylinders, des PU-Grafts

$$A = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot l$$

Ineinander eingesetzt ergibt das die Einheit

$$\tau = \frac{8 \cdot \eta \cdot l \cdot \dot{V}}{r^2 \cdot 2 \cdot \pi \cdot r \cdot l} = \frac{4 \cdot \eta \cdot \dot{V}}{\pi \cdot r^3} = \frac{N \cdot s \cdot m \cdot m^3}{m^2 \cdot m^3 \cdot m \cdot s} = \frac{N}{m^2} = \frac{10^{-5} \cdot dyn}{10^{-4} cm^2}$$

Für unseren Versuch stellen wir die Scherkraft über das sich dauernd ändernde Volumen dar

$$\tau = \frac{4 \cdot \eta \cdot \dot{V}}{\pi \cdot r^3}$$

$\dot{V}$ Volumen pro Sekunde

η dynamische Viskosität

r Radius

2.3.4 Viskosität des Perfusionsmediums

Die Perfusionsversuche wurden mit Endothelzellmedium (III) durchgeführt. Das Endothelzellmedium wurde im Institut für Klinische Chemie im Klinikum Großhadern mit dem Oswald Viskosimeter auf seine Viskosität hin untersucht. Bei 37°C lag die dynamische Viskosität bei 1,086 cP.

2.4. Probenaufbereitung für das Rasterelektronenmikroskop (REM)

2.4.1. Fixierung

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

2.4.2. Aufsteigende Alkoholreihe

Da im REM ein Vakuum aufgebaut wird, mussten die Proben komplett entwässert werden, um ein Sieden, des in den Proben enthaltenen Wassers zu verhindern. Deshalb wurden die Proben zunächst in einen Probenhalter (BALTEC GmbH, Schalksmühle) überführt 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, welches auch als Transportmedium des Probenhalters zum Kritisch-Punkt-Trockner (BALTEC GmbH, Schalksmühle) diente.

2.4.3. Kritisch-Punkt-Trocknen

Der Probenhalter wurde in die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners (BALTEC GmbH, Schalksmühle) 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_2 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_2 erreicht und es ging vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand über. Dabei trockneten die in der Kammer befindlichen Proben. Temperatur und Druck wurden 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, auf Probenhalter aufgeklebt werden, die vorher mit einer speziellen Leitfolie (beides BALTEC GmbH, Schalksmühle) beklebt worden waren.

2.4.4. 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 (BALTEC GmbH, Schalksmühle) 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.

2.4.5. Rasterelektronenmikroskopie

Die beschichteten Proben wurden an einem Rasterelektronenmikroskop (Leica, Bensheim) untersucht *(Plattner und Zingsheim, 1987)*. Hierzu wurden die Probenteller im Probenhalter der Vakuumkammer des Geräts fixiert und anschließend das Vakuum aufgebaut. Die Bilddarstellung erfolgte am Computer und über Ausdrucke auf Thermopapier am Videoprinter (Video Copy Processor P66DE, Mitsubishi, Tokio, Japan).

2.5 Vorbereitung der PU-Grafts für immunhistochemische Untersuchungen

Für die immunhistochemische Untersuchung entnahm man vom Rand der Grafts Proben, die vor der Perfusion ca. 5 mm breit und 5-8 mm lang waren. Nach Perfusion war es möglich, wesentlich größere Proben zu nehmen. Die Proben teilte man in der Mitte. Die eine Hälfte wurde in FIX II eingelegt und im Kühlschrank bei 8°C für die REM Bilder aufbewahrt, die andere Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Mit Hilfe eines Kryostaten (Leica Frigocult 2700) konnten Schichten von ca. 18 µm bis 22 µm geschnitten werden. Diese Schnitte wurden auf Objektträgern aufgebracht, die mit einer Eiweißlösung vorbehandelt waren und über Nacht im Wärmeschrank bei 60°C getrocknet.

2.5.1 Immunhistochemischer Nachweis vitaler humaner Zellen mittels Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper

Zur Färbung der Proben benutzte man ein Fertig-Kit (LSAB2-Kit HRP inkl.AEC, DAKO), das mit den jeweiligen Primärantikörpern ergänzt wurde. Es wurden CD 31 Antikörper (DAKO), Faktor VIII Antikörper (Von Willebrand Faktor, DAKO), Kollagen IV Antikörper (Sigma), Fibroblasten-Antikörper CD 90 (DAKO) und eNOS Antikörper (Transduction Laboratories) verwendet. Die Primärantikörper wurden verdünnt (CD31 1:100; Collagen IV 1:10; Faktor VIII 1:300; Fibroblast 1:50). Die Färbung verlief in folgenden Schritten:

- Die Objektträger trockneten an der Luft ca. 1 Stunde, dann inkubierte man sie für 5 Minuten in Aceton bei -20°C.
- Die Objektträger trocknete man erneut für 20 Minuten an der Luft bis das Aceton verdunstet war.

Die folgenden Schritte wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt:

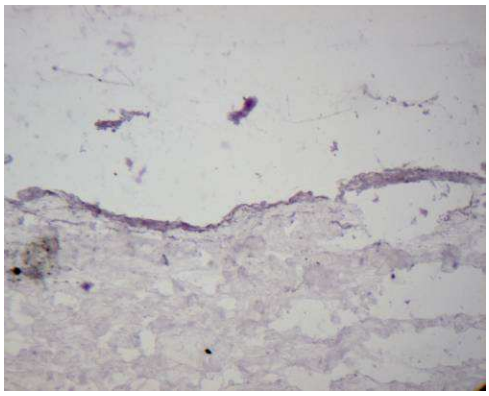
- Die Objektträger lagen für 10 Minuten in einer 0,01% H_2O_2-Lösung aus 200ml PBS (Gibco) und 20 µl H_2O_2 (Apotheke Klinikum Großhadern).
- Anschließend erfolgte eine 5 minütige Spülung in PBS.
- Die Primärantikörper wurden im Antikörper-Diluent verdünnt, dann auf die Objektträger gegeben und 30 Minuten inkubiert.

- Die Objektträger legte man für 5 Minuten in Tris-Tween 20 Puffer ein:
    - Tris 6,06g/l (50mM) (Merck)
    - NaCl 17,53 g/l (300mM) (Merck)
    - auf einen ph von 7,6 eingestellt, bevor
    - Tween 20 1 ml (0,1%) (Sigma) zugegeben wurde.
- Der zweite Antikörper (biotinylierter AK) wurde hinzugegeben und für 10 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert.
- 5 Minuten Spülung im Tris-Tween Bad.
- Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertes Streptavidin wurde hinzugegeben und in der feuchten Kammer inkubiert.
- Erneut Spülung im Tris-Tween-Bad für 5 Minuten.
- Zugabe des Farbstoffs und 10 Minuten Inkubation in der feuchten Kammer Aminoethylcarbazol (AEC).
- Spülung für 5 Minuten unter fließendem Wasser.
- Um die Zellkerne gegenüber der Peroxidasefärbung hervorzuheben führte man nun eine Gegenfärbung mit 20% Hämalaunlösung (in Aqua dest.) durch (Inkubation für 1-2 Minuten).
- Anschließend wurden die Objektträger 10 Minuten mit Leitungswasser gewässert, mit wasserhaltigem Medium eingedeckt und im Mikroskop bewertet.

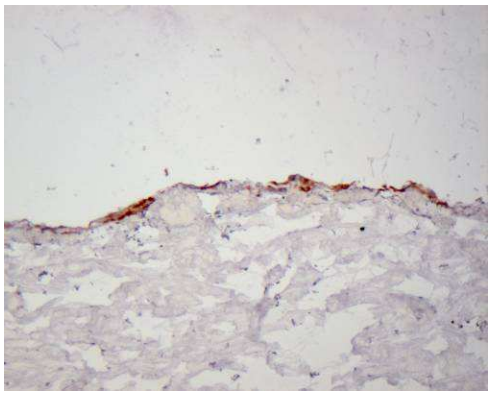
2.5.2 Beurteilung der Ergebnisse der Immunhistologie

Um die Ergebnisse der Immunhistologie miteinander vergleichen zu können, teilten wir die Ergebnisse der Färbungen in vier Kategorien ein:

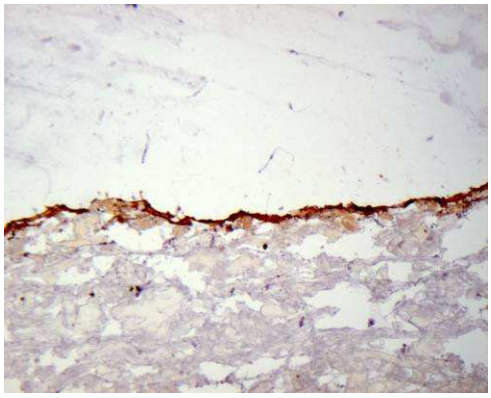
1. Negativer Nachweis der Antikörper



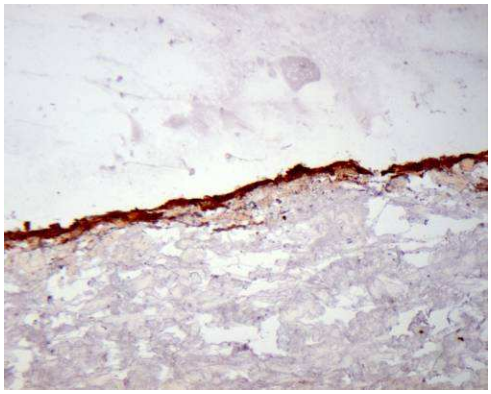
2. Vereinzelter Nachweis der Antikörper



3. Positiver Nachweis der Antikörper



4. Eindeutig positiver Nachweis der Antikörper



2.6 Verwendete Materialien

I (Fibroblast Growth Medium von Promocell, 30%FCS, Fetales Kälber Serum, Hitze inaktiviert; Lot. No° SO2892S180H; Biowest France)

II (Smooth Muscle Cell Growth Medium; SGM; Clonetics USA; 30% FCS Fetales Kälber Serum, Hitze inaktiviert; Lot. No° SO2892S180H; Biowest France)

III (Endothelial Cell Growth Medium Promocell + 10% FCS Fetales Kälber Serum, Hitze inaktiviert; Lot. No° SO2892S180H; Biowest France)

IV (M199 Earle (1x) 2.2g/L $NaHCO_3$; L-Glutamine Biochrom AG Berlin)

V (M199; 2000 IE Heparin; Gentamycin;)

VI (M199; 2000 IE Heparin; Gentamycin; 18% FCS, Fetales Kälber Serum, Hitze inaktiviert; Lot. No° SO2892S180H; Biowest France)

VII (Collagenase Typ II; 273 u/mg; Wothington NJ)

VIII (PBS-Dulbecco; Ca^{2+}, Mg^{2+}; tested for Endotoxin; Biochrom AG Berlin)

IX (Collagenase Typ 2; 273 u/mg; Wothington NJ gelöst in PBS mit 1% Humanalbumin)

X (Tissue Culture Dish 100X20mm, Becton Dickinson USA)

3. Ergebnisse

3.1 Zellgewinnung aus der Vena saphena magna

Für die Zellgewinnung wurden Venen von 41 Patienten verarbeitet. Die Länge betrug 12 cm (± 5 cm). Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei 71 Jahren (± 9 Jahre), 93% der Venen waren von männlichen Patienten. Die Venen lagen vor der Verarbeitung im Zelllabor durchschnittlich 2 Tage in M 199 im Kühlschrank. Aus den 41 Venen konnten 28 Kulturen angelegt werden, die zur Beschichtung der Prothesen geeignet waren. Bei zehn Kulturen war es möglich in ausreichender Zahl glatte Muskelzellen zu züchten, sechs für 18 mm und vier für die 4 mm PU-Prothesen.

3.2 Beschichtungen

3.2.1 Beschichtungen von 18 mm PU-Grafts

3.2.1.1 Beschichtung der 18 mm PU- Grafts mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen

Sechs von fünfzehn 18 mm PU Grafts konnten mit glatten Muskelzellen und Fibroblasten beschichtet werden. Nach einer Beschichtungsdauer von 24 Stunden wurden Proben für das Rasterelektronenmikroskop und für die Immunhistologie genommen. Im Rasterelektronenmikroskop zeigten sich in den untersuchten Proben vereinzelte Zellnester bis hin zu einem groben Zell-Layer. In der Immunhistologie ergab sich ein sehr unterschiedliches Bild, das vom vereinzelten Nachweis von Fibroblasten bis hin zu einem deutlich positiven Nachweis reichte.

Vor der Endothelbeschichtung wurden Proben von den Grafts untersucht, die im Rasterelektronenmikroskop einen groben bis konfluenten Zell-Layer und in der Immunhistologie einen positiven Fibroblastennachweis zeigten.

3.2.1.2 Beschichtung der 18 mm PU Grafts mit Fibroblasten

Neun von fünfzehn 18 mm PU Grafts wurden nur mit Fibroblasten beschichtet. Die Proben zeigten nach 24 Stunden Besiedelung unter dem Rasterelektronenmikroskop sowohl vereinzelte Zellnester als auch einen konfluenten Zell-Layer, bei einem durchweg positiven Nachweis in der Immunhistologie.

Vor der Endothelbeschichtung wurden Proben des Grafts genommen. Diese zeigten im Rasterelektronenmikroskop einen groben bis konfluenten Zell-Layer mit einem positiven Fibroblastennachweis in der Immunhistologie.

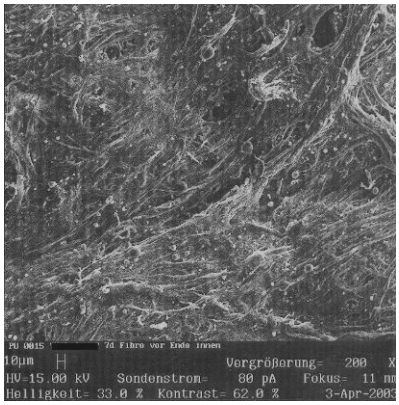


Abbildung 4:REM: Vergrößerung 200x : Konfluenter Fibroblasten Zelllayer auf einem 18mm PU-Graft vor Endothelbeschichtung.

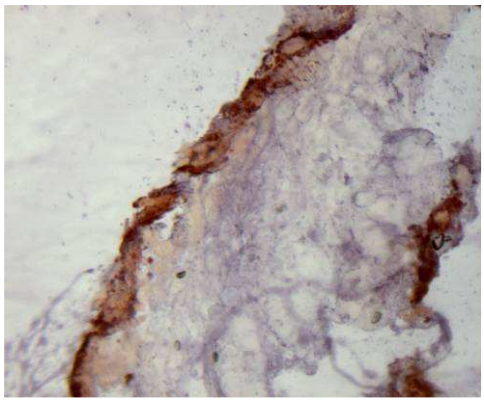


Abbildung 5: Vergrößerung 20x: Immunhistochemische Färbung auf Fibroblasten CD 90 eines 18mm PU-Grafts vor Endothelbeschichtung. Deutlich positive Reaktion (rotbraun) mit Wachstum in das Gewebe.

3.2.1.3 Endothelbeschichtungen

Sechs Tage nach der ersten Beschichtung der Prothesen, mit Fibroblasten allein oder mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen, wurden die Grafts 24 Stunden lang mit Endothelzellkulturen beschichtet und danach Proben für das Rasterelektronenmikroskop und die Immunhistologie entnommen und untersucht. 3 von 15 Proben zeigten im Rasterelektronenmikroskop Cobblestone-förmigen Zellteppich, der 60% der Oberfläche bedeckte. Die restlichen 12 Proben zeigten einen konfluenten Cobblestone Zell-Layer. Diese Proben wurden in der Immunhistologie auf Fibroblasten, Collagen IV, Faktor VIII (von Willebrandfaktor), und CD31 hin untersucht. Die Nachweise von Fibroblasten und Faktor VIII waren deutlich positiv, die von Collagen IV und CD 31 waren positiv.

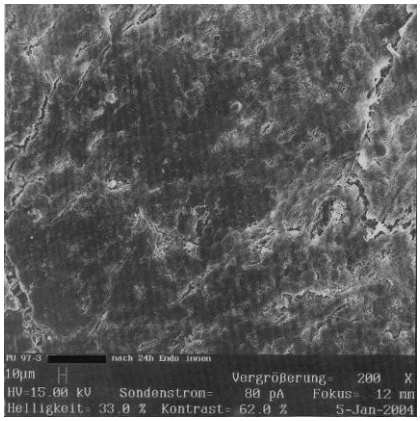
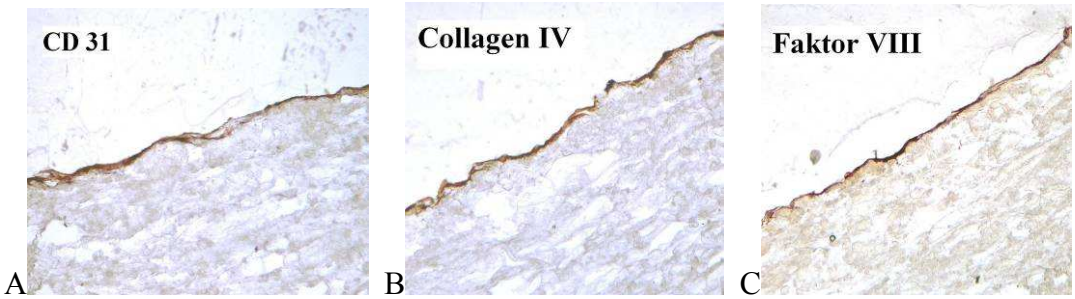


Abbildung 6 : **REM** Vergrößerung 200x: Nach 24h Endothelzellbeschichtung auf 18 mm PU-Graft: Konfluenter Zell-Layer mit leichter Cobblestone-förmiger Struktur



A B C

Abbildungen 7A/B/C: Immunhistochemische Färbungen von 18mm PU Graft nach 24h Endothel. Vergrößerung: 10x. Es zeigt sich eine positive Anfärbung (rotbrau) in 7 A für CD 31, in 7 B für Collagen IV und in 7 C für den Faktor VIII.

3.2.2 Beschichtungen von 4 mm PU-Grafts

Insgesamt acht 4 mm PU Grafts wurden beschichtet, davon waren vier von der Charge SB 0063 und vier von der Charge SB 0070, die sich in dem Sterilisationsverfahren unterschieden. Die Charge SB 0063 wurde mit Gammastrahlen, die Charge SB 0070 mit dem Ethylenoxidgas sterilisiert.

3.2.2.1 Fibroblasten- und glatte Muskelzellbeschichtung von 4 mm PU Grafts

Die Hälfte der acht 4 mm PU Grafts wurden mit Fibroblasten und die andere Hälfte mit glatten Muskelzellen und Fibroblasten beschichtet, davon je zwei Röhren von der Charge SB 0070 und zwei von der Charge SB 0063. Die nach 4 Tagen genommenen Proben wurden im Rasterelektronenmikroskop und in der Immunhistologie untersucht. Die 4 mm PU Grafts SB 0070 zeigten in drei Proben im Rasterelektronenmikroskop vereinzelte Zellnester, bei einer

Probe war nur die native Röhre zu sehen. Der immunhistologische Nachweis von Fibroblasten war bei zwei der SB 0070 Röhren positiv.
Bei zwei der 4 mm PU Grafts SB 0063 waren ein konfluenter Zell-Layer aus Fibroblasten und glatten Muskelzellen, bei den anderen zwei war ein 50-75% konfluenter Zell-Layer zu sehen. Der immunhistologische Nachweis war bei den SB 0063 Röhren dreimal eindeutig positiv (siehe 2.5.2) und einmal negativ.

3.2.2.2 Endothelbeschichtung von allen 4 mm PU Grafts

Erst kurz vor der Perfusion wurden wieder Proben genommen und im Rasterelektronenmikroskop und der Immunhistologie untersucht. Im Rasterelektronenmikroskop zeigten sich bei den SB 0070 Röhren in allen Proben große Zellnester aus kugelförmige, abgerundeten Zellen. Die Immunhistologie war sehr unterschiedlich und reichte von negativen bis zu eindeutig positiven Nachweisen.
Bei den SB 0063 Röhren zeigten sich im Rasterelektronenmikroskop bei 3 Proben ein Cobblestone Layer und bei einer Probe vereinzelte Zellnester. Die Proben reagierten in der Immunhistologie auf Fibroblasten, Collagen IV, Faktor VIII und CD31 positiv.

3.2.3 Beschichtung der 4 mm PU Grafts und Patches

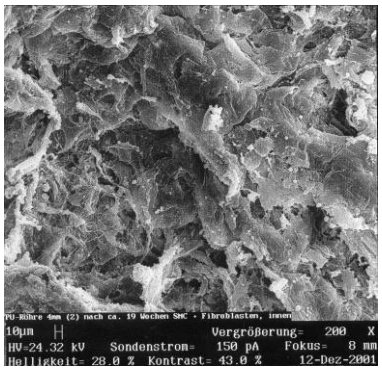
Zwei 4 mm PU Grafts und sechs 4 mm PU Patches wurden beschichtet. In einem Vorversuch untersuchte man zwei beschichtet 4 mm PU Grafts über mehrere Wochen hinweg auf ihr Wachstum.
Bei sechs 4 mm PU Patches wurde die Toxizität des Gases Ethylenoxid, mit dem die SB 0070 Röhren sterilisiert waren, auf Fibroblasten und glatten Muskelzellen untersucht. Dabei wurden die Chargen SB 00700 und SB 0063 einmal mit einer Spülung über 6 Stunden mit Fibroblastenmedium und einmal ohne Spülung verglichen.
Die Auswertung erfolgte ausschließlich mit dem Rasterelektronenmikroskop, da man hier hauptsächlich morphologische Veränderungen der Zellen erwartete.

3.2.3.1 Langzeitversuch mit zwei 4 mm PU Grafts

Es wurden zwei SB 0063 PU Grafts verwendet, die 30 Minuten im Fibroblastenmedium und im SGM gespült und anschließend mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen beschichtet worden waren. Bei einer Röhre erfolgte noch nach 5 Tagen eine Beschichtung mit Endothelzellen

3.2.3.1.1 Verlauf des Langzeitversuchs mit 4 mm PU Grafts ohne Endothelbeschichtung

Ein Tag nach der Fibroblasten- und glatten Muskelzellbeschichtung sah man im Rasterelektronenmikroskop große Zellnester auf der Innenseite und auf der Außenseite der nativen Röhre. Nach 53 Tagen zeigte sich auf der Innenseite ein konfluenter Zell-Layer mit einer Ausrichtung in eine Richtung, auf der Außenseite ein konfluenter Zell-Layer ohne Ausrichtung. Auf der Außenseite war das typische grobe Muster eines 4 mm PU Grafts zu erkennen. Nach 133 Tagen war die Röhre immer noch makroskopisch durchgängig. Im Rasterelektronenmikroskop sah man einen Zell-Layer, der nun an Struktur verloren hatte, sich aufwarf und den Eindruck erweckte, dass sich Zellen schon ablösten. Die Außenseite zeigte immer noch einen konfluenten Zell-Layer mit dem typischen Muster der Außenseite, wo sich noch die gewebte Struktur der PU-Prothese unter dem Zell-Layer erahnen lies.

A 

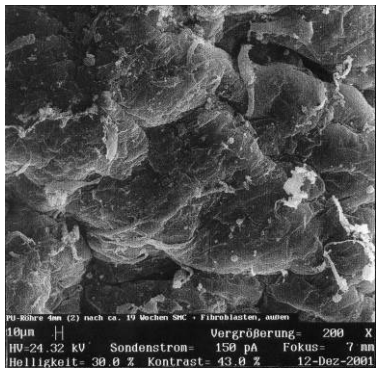
B 

Abbildung 8 A/B: REM: 4mm PU-Graft nach 133 Tagen Fibroblasten- und glatten Muskelzellbeschichtung. A: Innenseite mit einer 200x Vergrößerung. Es zeigt sich eine dicht bewachsene Oberfläche wo sich das typische Fibroblastenmuster aufzulösen beginnt. B: Außen 50x Vergrößerung. Konfluenter Zell-Layer mit den Aufwölbungen der Außenseite.

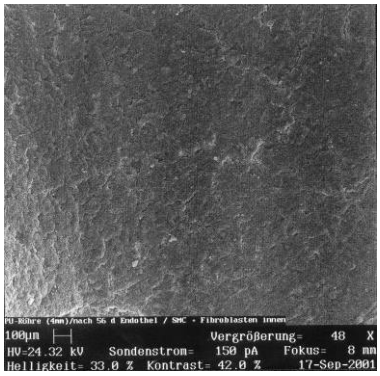
3.2.3.1.2 Verlauf des 4 mm PU Graft Langzeitversuchs mit Endothelbeschichtung

Ein Tag nach abgeschlossener Beschichtung mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen erkannte man im Rasterelektronenmikroskop große Zellnester auf der Innenseite und die native Röhre auf der Außenseite.

Drei Tage nach der Endothelbeschichtung und acht Tage nach Fibroblastenbeschichtung zeigte sich ein konfluenter Cobblestone Zell-Layer auf der Innenseite und eine native PU Röhre auf der Außenseite.

Nach 44 Tagen Endothel- und 49 Tagen Fibroblastenbeschichtung war ein konfluenter Cobblestone Zell-Layer auf der Innenseite zu sehen. Auf der Außenseite konnte man einen strukturierten Zell-Layer erkennen, der noch ein paar kleine Lücken aufwies.

Nach 56 Tagen Endothelbeschichtung zeigte sich auf der Innenseite ein konfluenter Endothelzell-Layer mit Cobblestone Morphologie, der mittlerweile Furchen aufwies. Die Außenseite war von einem konfluenten Zell-Layer umgeben, der Cobblestone-artige Strukturen aufwies.

A 

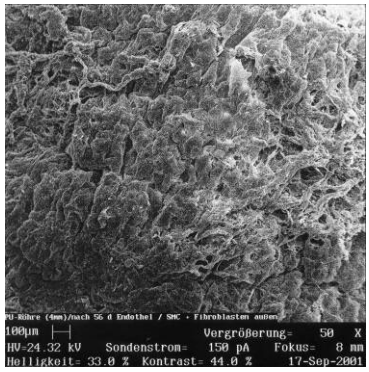
B 

Abbildung 9 A/B: REM: 4mm PU- Graft nach 56 Tagen Endothel- und 61 Tagen Fibroblastenbeschichtung, beides 50x Vergrößerung. A: Innenseite: Ein konfluenter Cobblestone Zell-Layer. B: Außen: Cobblestone-förmige Zellmuster auf der aufgeworfenen Oberfläche der Außenseite.

Nach 122 Tagen zeigte sich immer noch ein makroskopisch durchlässiger 4 mm PU Graft. Im Rasterelektronenmikroskop war der Cobblestone Layer mittlerweile tief gefurcht und es lösten sich einzelne Zellen ab.

3.2.3.2 Toxizitätsuntersuchung mit Fibroblasten und mit glatten Muskelzellen auf SB 0070 Patches ohne Spülung

Vier Tage nach der Fibroblastenbeschichtung bedeckte ein Zell-Layer ca. 25-50% der Oberfläche des Patches. Auf dem Zell-Layer waren sowohl einzelne abgerundete Zellen als auch kleinere kugelförmige Auflagerungen auf dem Zell-Layer zu sehen.

Nach 6 Tagen konnte man sehr viele abgerundete Zellen auf dem noch vorhandenen Zell-Layer erkennen.

Nach 8 Tagen war am Rand dieser Probe noch ein Rest von dem Zell-Layer vorhanden, ansonsten waren viele abgerundete Zellen auf einer nativen Innenfläche der Röhre zu sehen.

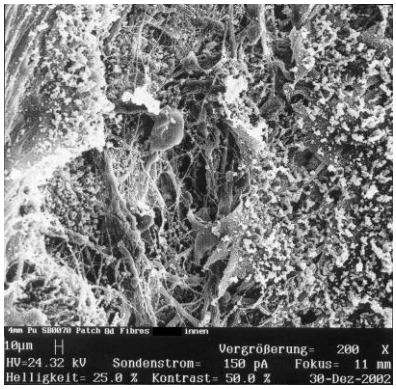


Abbildung 10 REM: Vergrößerung 200x: 4mm Patch SB 70 nach 8 Tagen Fibroblastenbeschichtung.. Es lösen sich immer mehr Zellen von dem Zellteppich und dem PU-Graft ab, was man deutlich an den beiden Bildrändern erkennen kann.

Drei und sechs Tage nach der glatten Muskelzellbeschichtung waren jeweils nur abgerundete Zellen auf der Innenseite der Röhre zu erkennen. Es hatten sich weder Zell-Layer noch Zellnester gebildet.

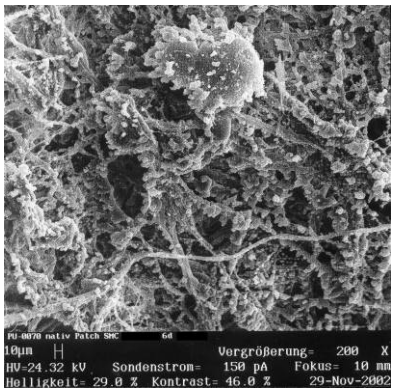


Abbildung 11 REM: Vergrößerung 200x: 4mm Patch SB 70 nach 6 SMC Beschichtung. Es zeigt sich außer den abgelösten kugeligen Zellen kein Zellverband

3.2.3.3 Vergleich von SB 0063 Patch und SB 0070 Patch ohne Spülung und nach 6 Stunden Spülung

3.2.3.3.1 Verlauf des Vergleichs zwischen SB 0070 und SB 0063 ohne Spülung

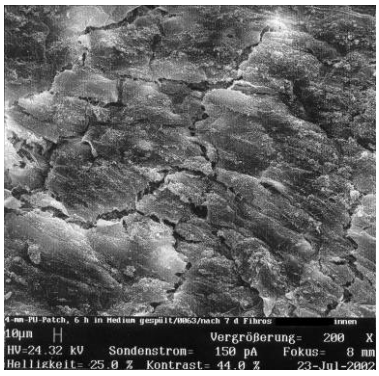
Am 6. Tag nach Fibroblastenbeschichtung und vor der Endothelbeschichtung wurde jeweils eine Probe genommen. Auf der SB 0063 zeigten sich vereinzelte Zellnester, auf der SB 0070 war nur die native Oberfläche der PU Röhre zu sehen.

Die Proben zeigten nach 13 Tagen Fibroblasten- und 7 Tagen Endothelbeschichtung auf der SB 0063 einen reinen konfluenten Endothelzell-Layer, auf der SB 0070 Röhre fanden sich Zellen, die zwar an der Oberfläche anhafteten, aber nur noch ca. 25-50% der Oberfläche

bedeckten. Morphologisch wiesen die einzelnen Zellen keinen Zusammenhalt mit anderen Zellen auf. Es waren viele kleine kugelförmige Auflagerungen auf dem Zell-Layer zu erkennen.

3.2.3.3.2 Verlauf des Vergleichs zwischen SB 0070 und SB 0063 nach 6 Stunden Spülung

Nach 7 Tagen Fibroblastenbeschichtung zeigte sich in beiden Proben ein konfluenter Zell-Layer. Bei der SB 0070 gab es zusätzlich noch kugelförmige Ablagerungen auf dem Zell-Layer.

A 

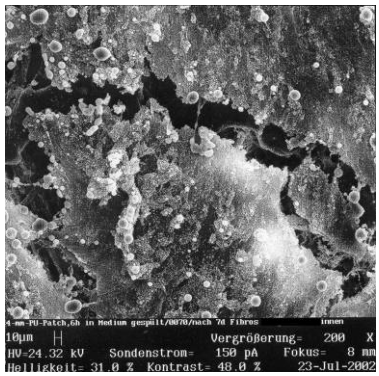
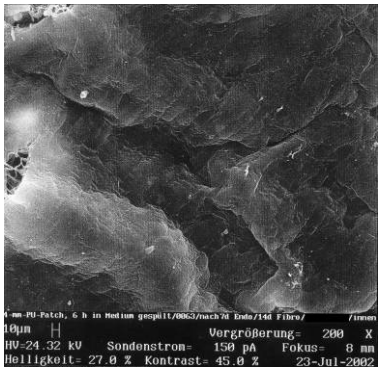
B 

Abbildung 12 A/B REM: Vergrößerung 200x 4mm Patches mit 6h Spülung in Fibroblastenmedium nach 7d Fibroblastenbeschichtung. A: SB 63 Ein konfluenter Fibroblastenzell-Layer. B: SB 70 Ein konfluenter Fibroblastenzell-Layer mit kugelförmigen Auflagerungen.

Nach 14 Tagen Fibroblasten- und 7 Tagen Endothelbeschichtung zeigte sich in beiden Proben ein konfluentes Cobblestone Zellmuster mit flachem Relief der Zellen. Es waren keine Ablagerungen mehr sichtbar.

A 

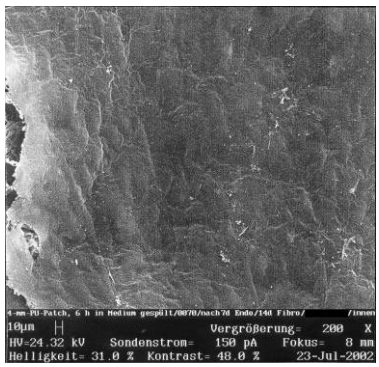
B 

Abbildung 13 A/B REM: Vergrößerung 200x: 4mm Patch mit 6h Vorspülung. Nach 7 Tagen Endothel- und 14 Tagen Fibroblastenbeschichtung. Es zeigt sich in beiden Abbildungen A und B ein fast identisches Bild eines konfluenten Endothelzell-Layers mit einem Cobblestone Zellmuster**.**

3.3 Perfusionen

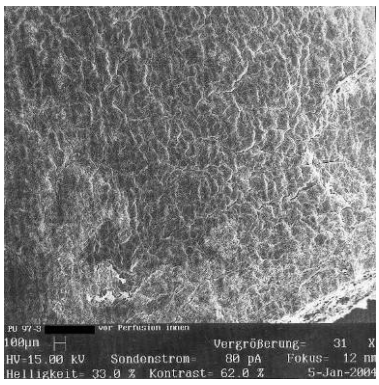
Es wurden insgesamt fünfzehn 18 mm PU Grafts und vier 4 mm PU Grafts perfundiert. Das Ziel war bei allen Perfusionen ein pulsatiler Fluss von 72 $^{1}/_{Min.}$ bei einem Druck von 80-120 mmHg über 2 Stunden, was einer durchschnittlichen Shear Stress von 1,57 $^{dym}/_{cm^2}$ auf eine Minute verteilt entspricht.

3.3.1 Perfusion von 18mm PU-Grafts

Die 18 mm PU Grafts wurden 2 Stunden lang bei einer Pulsation von 72 $^{1}/_{Min.}$ einem Durchfluss von 0,5 $^{Liter}/_{Min.}$ und einem Druck von 80-120 mmHg perfundiert. Es wurden verschiedene Vorlaufzeiten gewählt. Als Vorlauf definierte man die Zeit, in der der Druck und der Durchfluss exponentiell auf die Zielwerte gesteigert wurden. Der Vorlauf wurde in 5 Gruppen für je drei 18 mm PU Grafts auf 0, 15, 30, 45 oder 60 Minuten festgelegt.

3.3.1.1 Status der 18 mm PU Grafts vor der Perfusion

Kurz vor der Perfusion wurden Proben entnommen und untersucht. Im Rasterelektronenmikroskop war in allen Proben der 18 mm PU Grafts ein konfluenter Endothelzell-Layer zu sehen, in der Immunhistologie zeigte sich in den Färbungen mit Antikörpern gegen Fibroblasten, Collagen IV, Faktor VIII und CD 31 jeweils ein deutlich positiver Nachweis.

A 

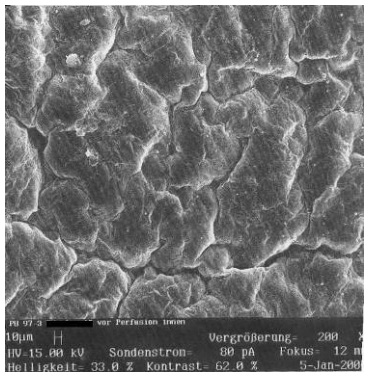
B 

Abbildung 14 A/B REM: 18mm PU-Graft vor Perfusion. A: Vergrößerung 30x In der Übersichtsaufnahme zeigt sich ein intakter Zell-Layer. B: Vergrößerung 200x: Es zeigt das typische Bild vom Cobblestonemuster, wie es sich unter statischen Bedingungen ausbildet.

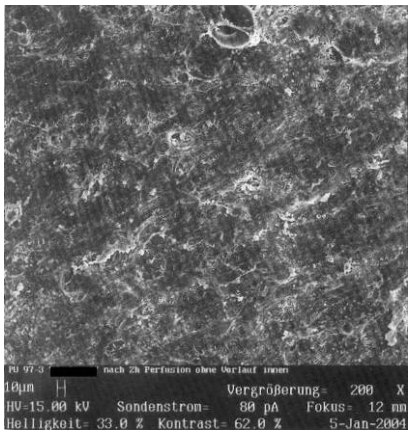
3.3.2 Aufbereitung der 18 mm PU Grafts nach der Perfusion

Nach der Perfusion schnitt man die 18 mm PU Grafts aus den Gefäßprothesen heraus und teilte sie in Längsrichtung. Es wurden Proben für das Rasterelektronenmikroskop und die Immunhistologie gewonnen und aufbereitet.

3.3.2.1 Status nach der Perfusion bei 0 Minuten Vorlauf

Die Proben zeigten im Rasterelektronenmikroskop eine komplette Zerstörung des Cobblestone Zellmusters. Zu sehen war ein konfluenter Zell-Layer, der abgeflacht und ausgedünnt aussah. In den höheren Vergrößerungen waren einige, für Fibroblasten typische Ausläufer der Zellen und längliche Ausrichtungen der Zellkörper zu sehen. Man sah, dass sich die Zellen hauptsächlich in den Zwischenräumen des PU-Grafts drängten, und so das grobe Muster des PU-Grafts nachzeichnete.

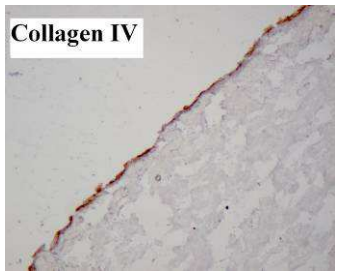
Die Immunhistologie spiegelte dieses Bild wider, es gab einen positiven Nachweis auf Fibroblasten, und Collagen IV. Der Faktor VIII konnte nur vereinzelt und CD 31 und eNOS gar nicht nachgewiesen werden.

A 

B

Abbildung 15 A/B REM: 18mm PU-Graft nach 2h Perfusion ohne Vorlauf. A: Vergrößerung 200x zeigt die großflächige Destruktion des Cobblestone Zell-Layers. B: In der Vergrößerung 1000x ist eindeutig das Fibroblasten Zellmuster zu sehen.

A

B 

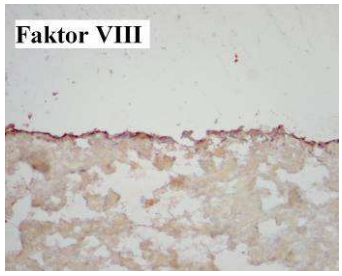
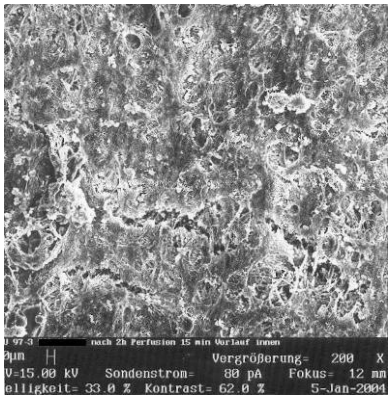
C 

Abbildung 16 A/B/C: 18mm PU-Graft nach 2h Perfusion ohne Vorlauf. Vergrößerungen: 10x.

A: Im Fibroblastennachweis ist eine eindeutige Einwanderung von Fibroblasten in den PU-Grafts zu sehen. B: Trotz Verlust der Endothelzellen ist das Collagen IV der Basalmembran noch nachweisbar. C: Es sind vereinzelte Nachweise des Faktor VIII (rotbraune Punkte) zu sehen.

3.3.2.2 Status nach der Perfusion bei 15 Minuten Vorlauf

In allen drei Proben zeigte sich im Rasterelektronenmikroskop ein konfluenter Zell-Layer, in zwei Proben zeigten sich im Zell-Layer vereinzelte Lücken von ca. 10% Größe, die schwer von den Trocknungsartefakten abzugrenzen sind. In den höheren Vergrößerungen sah man, dass es sich um zwei verschiedene Zellschichten handelte. Die untere Schicht hatte (wie unter 3.3.2.1 beschrieben) das typische Zellmuster von Fibroblasten. Darüber zeigte sich eine Schicht, die in 2 Proben nur ca. 30% und in einer Probe ca. 50% der Oberfläche ausmachte und eher einen deckenden Charakter im Vergleich zu den Fibroblasten hatte. In der 1000x Vergrößerung sah man dann deutlich, dass die Zellen immer noch ein Cobblestone artiges Oberflächenrelief zeigten.

A 

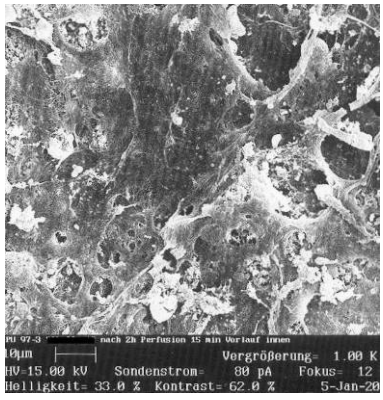
B 

Abbildung 17 A/B REM : 18mm PU-Graft nach 2 h Perfusion mit 15 min Vorlauf . A: Vergrößerung 200x zeigt einen konfluenten Zell-Layer mit Trocknungsartefakten und dichteren Zellarealen. B: Vergrößerung 1000x. Die dichteren Zellareale zeigen ein Cobblestonemuster in der Mitte, umgeben von den typischen Fibroblasten Zellmustern.

In der Immunhistologie war bei allen drei Proben der Nachweis von Fibroblasten und Faktor VIII eindeutig positiv. Somit handelte es sich bei der oberflächlichen Zellschicht um Endothelzellen, was durch die Färbungen gegen CD 31 bestätigt wurde. Die Collagen IV und CD 31 Färbung war bei zwei Proben positiv und zeigte in einer Probe nur einen schwachen Nachweis. eNOS zeigte nur bei den Proben mit der positiven CD 31 Färbung einen schwachen Nachweis.

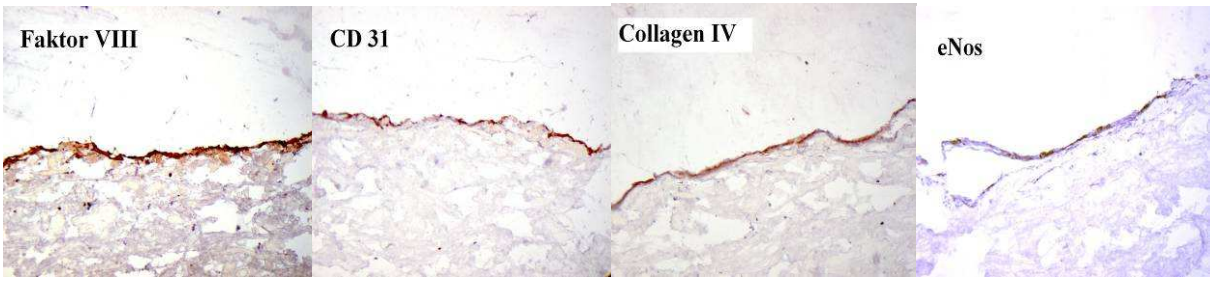


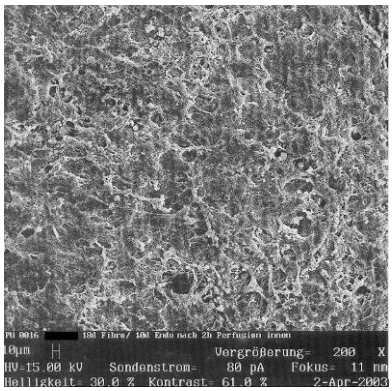
Abbildung 18: Immunhistochemische Färbungen, 18mm PU-Graft nach 2h Perfusion mit 15 min Vorlauf. Vergrößerungen 10x. Faktor VIII Nachweis ist eindeutig hoch positiv zu sehen, CD31 und Collagen IV positiv. eNOS zeigt vereinzelte rotbraune Anfärbungen in dem Zell-Layer.

3.3.2.3 Status nach der Perfusion bei 30 Minuten Vorlauf

Im Rasterelektronenmikroskop zeigte sich in allen Proben ein konfluenter Zell-Layer.

In der ersten Probe war der Zell-Layer sehr flach und glatt, fast wie planiert. In den Defekten, die etwa 25% der Oberfläche ausmachten, waren eindeutig Fibroblasten zu sehen.

Bei der zweiten Probe hatte der Zell-Layer eine wabige Struktur, mit vielen kleineren Defekten, die etwa 40% der Oberfläche ausmachten. Darin zeigten sich auch Fibroblasten. Die vorhandenen Endothelzellen bildeten ein sehr flaches Muster, das sich in der Flussrichtung ausgerichtet hatte.

A 

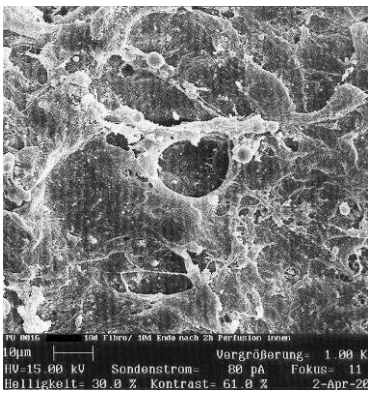
B 

Abbildung 19 A/B REM: 18 mm PU-Graft nach 2h Perfusion mit 30 Min. Vorlauf.

A: Vergrößerung 200x: Cobbelstoneförmiger Zell-Layer der ca. 40% der Oberfläche ausmacht, darunter ein konfluenter Zell-Layer mit Fibroblastenmorphologie. B. Vergrößerung 1000x zeigt eindeutig das Cobblestonezellmuster der Endothelzellen.

Die letzte Probe ließ in der oberflächlichen Zellschicht ein langgestrecktes flaches Zellmuster erkennen, das ein Cobblestone Zellmuster erahnen ließ. Es waren keine nennenswerten Zelldefekte zu sehen.

Die Immunhistologie zeigte in den Proben 2 und 3 einen positiven, in der Probe 1 einen deutlich positiven Nachweis von Fibroblasten und Collagen IV. Der Faktor VIII war in Probe 1 und 3 deutlich positiv und in Probe 2 positiv. CD 31 konnte in allen 3 Proben positiv bewertet werden, eNOS war vereinzelt nachweisbar.

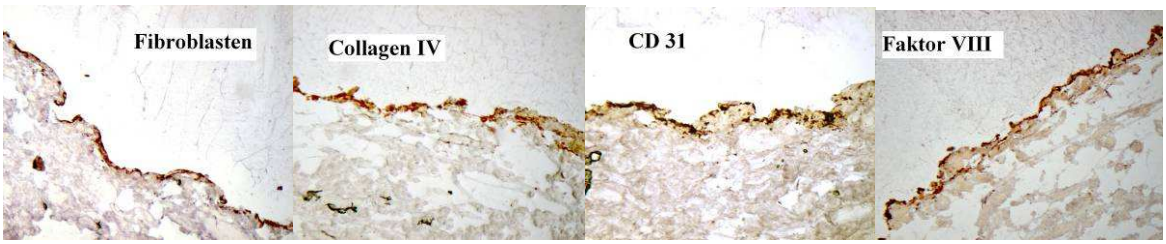
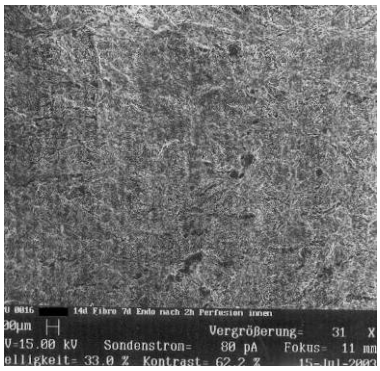


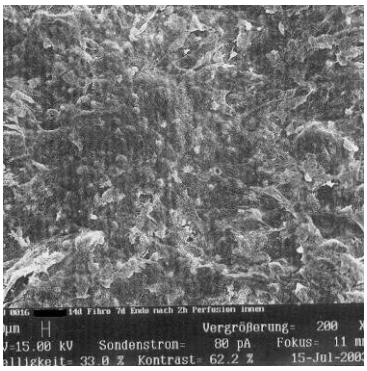
Abbildung 20: Immunhistochemische Färbungen von 18 mm PU-Grafts nach 2h Perfusion mit 30 Min. Vorlauf. Es zeigt sich im immunhistochemischen Nachweis von Fibroblasten, Collagen IV, CD31 und Faktor VIII ein positiver (rotbraun) Nachweis.

3.3.2.4 Status nach der Perfusion bei 45 Minuten Vorlauf

Im Rasterelektronenmikroskop zeigte sich in allen 3 Proben andeutungsweise ein Cobblestoneartigen Zell-Layer, der abgeflachter und ausgedünnter aussah als vor der Perfusion.

In Probe 1 ließ sich in der Übersichtsaufnahme die Struktur der PU-Röhre erahnen. Der gesamte Zell-Layer scheint durch die Perfusion in die Struktur des Grafts gedrückt. Zwischen den großen Cobblestoneartigen Flächen waren auch Stellen zu sehen, bei denen Zellen abgelöst worden waren, ohne dass der Zell-Layer zerstört wurde. Diese Defekte machten maximal 10% der Oberfläche aus.

A 

B 

Abbildungen 21 A/B REM: 18 mm PU-Graft nach 2h Perfusion mit 45 Min. Vorlauf. A: Vergrößerung 31x. In der Übersicht deutet sich das grobe Muster der PU-Röhre an, das aber immer mit Zellen bedeckt ist. B: Vergrößerung 200x Cobblestoneförmiges Zellmuster mit Zellausrichtung.

In der Immunhistologie gab es in allen Proben einen positiven Nachweis für Fibroblasten und einen hoch positiven Nachweis für Collagen IV, Faktor VIII und CD 31 und einen vereinzelten Nachweis von eNOS.

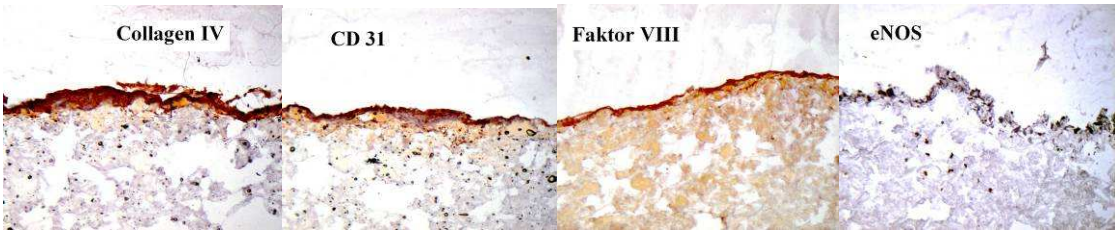
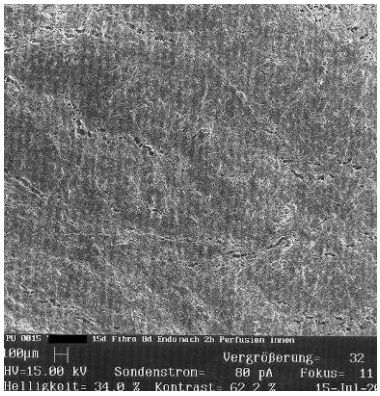


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbungen 18 mm PU-Graft nach 2h Perfusion mit 45 Min. Vorlauf. Vergrößerungen 10x. Durch die hoch positiven Anfärbungen auf Collagen IV , CD 31 und Faktor VIII kann ein konfluenter Endothelzell-Layer nach der Perfusion nachgewiesen werden. Der Nachweis von eNOS ist auch hier wieder auf einzelne Zellflecken begrenzt.

3.3.2.5 Status nach der Perfusion bei 60 Minuten Vorlauf

Im Rasterelektronenmikroskop sah man in allen Proben einen konfluenten Zell-Layer. Es war ein flaches glattes Cobblestone Muster zu sehen. Zwischendurch sah man kleinere Lücken mit lang gestreckten Zellen; diese machten ca. 10 % der Oberfläche aus.

A 

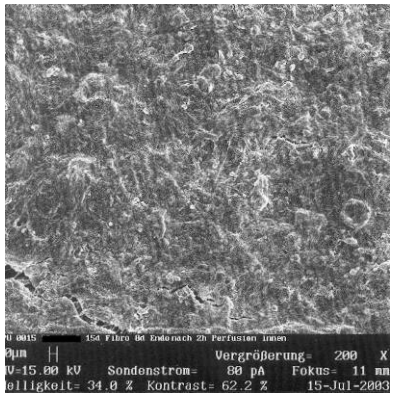
B 

Abbildung 23 A/B REM: 18 mm PU-Graft nach 2h Perfusion mit 60 min. A: Vergrößerung 31x. In der Übersicht deutet sich das grobe Muster der PU-Röhre an, das aber immer mit Zellen bedeckt ist. B: Vergrößerung 200x. Cobblestoneförmiges Zellmuster mit Zellausrichtung.

Die Immunhistologie ergab einen deutlich positiven Nachweis für Fibroblasten und Faktor VIII und einen positiven Nachweis für Collagen IV und CD 31, eNOS war vereinzelt positiv.

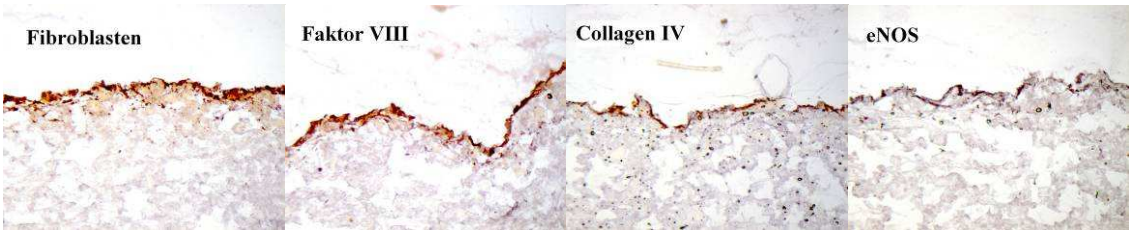


Abbildung 24: Immunhistochemische Färbungen: 18 mm PU-Graft nach 2h Perfusion mit 60 min Vorlauf. In der Fibroblasten Färbung ist das Einwachsen in den PU-Graft gut zu sehen. Die Färbungen Faktor VIII und Collagen 4 sind zusammen mit den REM-Bildern ein eindeutiger Nachweis für einen intakten Endothelzelllayer. Der Nachweis von eNOS ist nur in vereinzelten Zellen möglich.

3.3.3 Perfusion von 4 mm PU-Graft

Bei der Perfusion wurde derselbe Shear Stress erreicht wie bei den großen Röhren.

3.3.3.1.1 Status der 4 mm PU Grafts SB 0070 vor der Perfusion

Im Rasterelektronenmikroskop zeigten sich bei den SB 0070 kurz vor Perfusion in allen Proben kleine Zellnester aus kugelförmigen Zellen.

Die Immunhistologie war sehr unterschiedlich und reichte von negativen bis zu positiven Nachweisen von Fibroblasten, Faktor VIII und CD 31. Collagen IV war in keiner Probe nachzuweisen.

3.3.3.1.2 Status der 4 mm PU Grafts SB 0063 vor der Perfusion

Kurz vor der Perfusion ließen sich im Rasterelektronenmikroskop bei 3 der SB 0063 Proben ein Cobblestone-Layer und bei einer Probe vereinzelt kugelige Zellnester erkennen. Die Proben waren in der Immunhistologie auf Fibroblasten, Collagen IV, Faktor VIII und CD31 positiv.

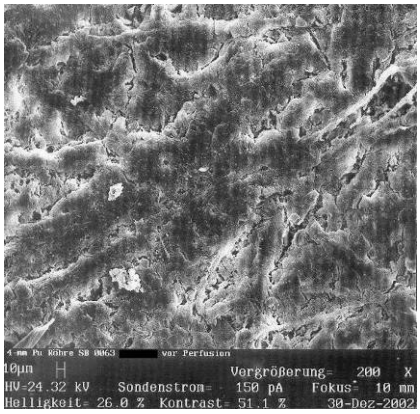


Abbildung 25 REM: Vergrößerung 200x: 4 mm SB 63 PU-Graft vor Perfusion. Man kann deutlich ein Cobblestonemuster der Zellen erkennen. Die Risse und Furchen sind Trocknungsartefakte und entstanden beim Aufbereiten der kleinen Röhre.

3.3.3.2.1 Status der 4 mm PU Grafts SB 0070 nach der Perfusion

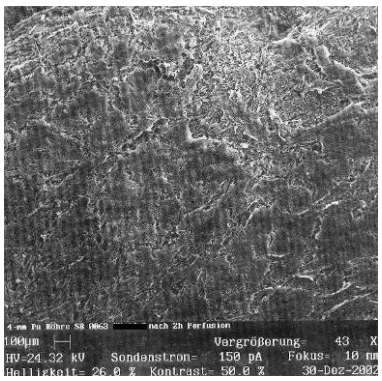
Der schlechte Zustand der 4 mm PU Grafts SB 0070 nach der Beschichtung erlaubte keine Perfusion. Grund hierfür ist das Sterilisationsverfahren der Charge SB 0070 der Grafts mit dem Gas Ethylenoxid.

3.3.3.2.2 Status der 4 mm PU Grafts SB 0063 nach der Perfusion

Nach der Perfusion zeigte sich die Probe mit den kugeligen Zellen unverändert. Die kugeligen Zellnester bedeckten ca. 70% der Oberfläche.

Bei den anderen 3 Proben zeigte sich ein konfluenter Zell-Layer, der sehr flach und glatt aussah und das Cobblestone Muster in der glatten Oberfläche erahnen ließ.

In der Immunhistologie war in allen vier Proben der Nachweis von Fibroblasten, Collagen IV, Faktor VIII, CD 31 positiv bis deutlich positiv.

A 

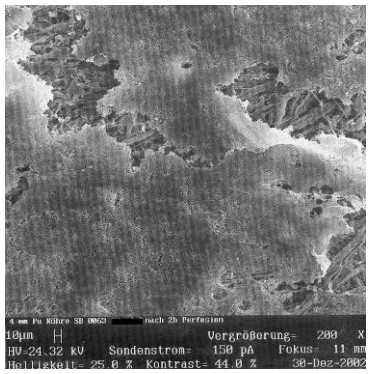
B 

Abbildung 26 A/B REM:. 4 mm SB 63 PU-Graft nach 2h Perfusion mit 30 Min. Vorlaufzeit. A: Vergrößerung 41X: ES zeigen sich große Zellfelder, die durch Trocknungsartefakte auseinander gerissen wurden. Man erkennt eindeutig die Symmetrie der Felder zueinander. B: Vergrößerung 200x zeigt den ehemaligen Cobblestone Zell-Layer wie flach gewalzt.

Die Untersuchungen zeigen, dass sich ein konfluenter Endothelzelllayer aus adulten Endothelzellen auf einer Basis aus Fibroblasten, die sich in den PU-Röhren verwachsen hatten. etablieren kann. Die durch die statische Kultivierung verloren gegangene Widerstandskraft gegen Scherkräfte konnte in vitro in Abhängigkeit der Vorlaufzeit wieder hergestellt werden. Hier zeigte sich, dass unter den Versuchsbedingungen der entscheidende Zeitpunkt bei einer Vorlaufszeit von 30 Minuten liegt.

4. Diskussion

4.1 Zellgewinnung aus der Vena Saphena Magna

Die Endothelzellgewinnung aus der Vena Saphena magna wurde mehrfach in der Literatur beschrieben (*Bengtsson. et al. 94*; *Kann et al. 92; Terramani et al. 00; Haegerstrand et al. 92; Fischlein et al. 94; 96*). Diese Vene ist einfach und ohne große Probleme für den Patienten zu entnehmen. Dies geschieht in der Herzchirurgie hauptsächlich im Rahmen einer Bypassoperation, kann aber auch speziell für diesen Zweck, unter Lokalanästhesie entnommen werden, was für eine routinemäßige und standardisierte Zellgewinnung von Nutzen ist.

Die primäre Endothelzellausbeute ist von der Länge der Vene, der Zeit von OP bis zur Verarbeitung und von der Entnahmetechnik abhängig.

Das Wachstum der Zellkulturen ist abhängig von Art und Menge der Nährstoffe, insbesondere von den Serumzusätzen (*Terramani et al. 00*). Die verwendeten Seren (FCS), die von den Herstellern aus verschiedenen Tieren gewonnen wurden, hatten großen Einfluss auf das Wachstum der Zellkulturen. Daneben spielte die Hitzeinaktivierung des Serums eine wichtige Rolle, da dabei nicht nur Spezies spezifische Faktoren und immunologische Komponenten deaktiviert werden, sondern auch ein Teil der wichtigen Wachstumsfaktoren. Die Verwendung eines gepoolten menschlichen Serums wäre keine Alternative gewesen, da man auch in diesem Fall eine Hitzeinaktivierung hätte durchführen müssen.

Die einzige echte Alternative ist die Verwendung von autologem Serum. Ein solches wurde in unserem Labor im Rahmen einer Implantation eines endothelialisierten Homografts verwendet (*Gulbins et al. 03*), und zeigte ein wesentlich besseres Zellwachstum.

Die Fibroblastengewinnung aus einer Vene, die vorher für die Endothelzellgewinnung verwendet worden war, ist noch nicht in der Literatur beschrieben. Die von den Endothelzellen befreite Vene hatte den Vorteil, dass man sehr reine Fibroblastenkulturen gewinnen konnte. Von Vorteil war auch, dass dem Patienten keine weitere Vene entnommen werden musste und dass man aufgrund der Herkunft ein fertig ausdifferenziertes Zellmaterial für die Verwendung in Gefäßprothesen hatte.

Eine weitere Idee für die Herstellung von Tissue engineerten Gefäßprothesen war die Verwendung von glatten Muskelzellen. Bei der Zellgewinnung gelang es uns nicht, trotz verschiedener Ansätze, ein Verfahren zu etablieren, das genügend glatte Muskelzellen aus einer schon für die Endothel- und Fibroblastenzellgewinnung benutzte Vene, zum Beschichtungszeitpunkt hervorbrachte. Das Hauptproblem dabei war, dass nicht schnell

genug glatte Muskelzellen aus den Muskelstücken aussprossen, die weiter kultiviert werden konnten. Dies liegt sicher auch daran, dass Venen im Gegensatz zu Arterien einen wesentlich kleineren Anteil an glatten Muskelzellen in der Media haben, was dazu führt, dass man nicht genug Ausgangsmaterial zur Verfügung hat. Damit ist zu erklären, dass nur sechs von fünfzehn 18 mm PU Grafts mit Muskelzellen beschichtet wurden. Andere Forschungsgruppen, die glatte Muskelzellen für die Beschichtung für Gefäßprothesen verwendeten, nahmen zur Gewinnung Arterien *(Wen et al. 05)*, was bei einem klinischen Einsatz zu einem größeren Trauma führt. Weiter ist der Frage nachzugehen, ob und inwieweit der glatte Muskelzellanteil in dem Bypass das Outcome beeinflussen kann. Hier ergeben sich noch interessante Untersuchungsansätze.

Viele Arbeitsgruppen, die im Bereich des Tissue Engineering Gefäßprothesen beschichten oder herstellen, benutzen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene oder deren Blut (*Boyer et al. 00*; *Kann et al. 92; Terramani et al. 00; Jaffe et al. 76; Wu et al. 04*) . Es ist sicher einfacher, hieraus geeignetes Ausgangsmaterial zu gewinnen, als aus der Vena Saphena Magna, da das Alter der Spender nicht so stark variiert und Gefäßerkrankungen selten auftreten. Die Zellgewinnung aus der Nabelschnurvene ist von großer Bedeutung für das Tissue Engineering von Herzklappen und Gefäßen bei kongenitalen Vitien, da bei Säuglingen und Kleinkindern die Gewinnung aus autologen Zellen aus der Vena Saphena problematischer ist als beim Erwachsen. Auch muss das aus Vorläuferzellen gewonnene Zellenmaterial aus der Nabelschnur und dem peripheren Blut auf eine mögliche kanzerogene Mutation untersucht werden (*Strehl et al. 02*), weil diese Vorläuferzellen erst noch durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zu Endothelzellen ausdifferenzieren müssen, und ihre Pluripotenz auch die Entwicklung von Krebszellen beinhaltet.

Da aber der durchschnittliche Patient in der Herzchirurgie älter als 50 Jahre ist, stellt die Gewinnung von Gefäßzellen aus der Nabelschnurvene keine Alternative für die Masse der heutigen Patienten in der Bypasschirurgie dar, zumal deren Kanzerogenität noch geklärt werden muss.

Die autologe Zellgewinnung dagegen hat den Nachteil, dass jede Vene die man benutz eine andere Qualität im Bezug auf die Zellkultur bietet, die im wesentlichen durch das Alter des Patienten und dessen Vorerkrankungen ungünstig bestimmt wird. Und gerade Patienten in der Herzchirurgie leiden unter schweren Gefäßerkrankungen die die Regenerationsvorgänge des Zellverbundes beeinträchtigten und das Anzüchten von autologen Zellen erschweren.

4.2 Beschichtung von PU-Röhren

Unser Ziel war es, die Biokompatibilität von künstlichen Gefäßprothesen und Klappen zu erhöhen. Der Körper soll dieses Material als körpereigen erkennen, damit die Thrombogenität verringert wird, weil sonst Embolien und Thrombosen nach Implantation beim Patienten zu befürchten sind.

Durch die Vorbeschichtung der PU-Röhren mit Bestandteilen der Basalmembran wie Fibronectin, Laminin oder Angiogenin konnte die Anhaftung der Endothelzellen an den Oberflächen deutlich gesteigert werden (*Bengtsson et al. 94; Kadletz et al. 87; Kent et al. 92; Vohra et al. 92; Lee et al. 93; Kirkpatrick et al. 90; Zünd et al. 98*). Um aber eine optimale Anhaftung zu erreichen, sollte die Beschichtung dieselbe Zusammensetzung wie die natürliche Matrix haben, also eine künstliche Basalmembran bilden (*Consigny et al. 98; Darnell et al. 90; Jansson. et al. 01*). Diese Basalmembran muss nicht nur durch die Proteine, welche von Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen gebildet werden, die Anhaftung der Endothelzellen gewährleisten, sondern auch das Überleben und die Funktion einer jeden Gefäßzelle steuern. Aus diesen Überlegungen entstand die Idee von einer Matrix, die aus autologen Fibroblasten und glatte Muskelzellen gebildet wird und als Grundlage für eine spätere Endothelbeschichtung dient. Auf diese Weise sollen die Anhaftung, das Überleben und die Funktion der Endothelzellen verbessert werden.

Damit die Fibroblasten gut auf der PU-Röhre haften können, hat diese keine glatte Oberfläche, sondern besteht aus einem dreidimensionalen Gewebe. Hergestellt wird dies, indem man dünne PU-Fasern mit einer Lösung gegen einen Metallstab mit entsprechenden Durchmesser sprüht, die so genannte soluble blown technique. Dadurch entstehen viele kleine Räume zwischen den aufeinander liegenden PU-Fäden, in die die Fibroblasten einwandern und sich durch ihre Pseudopodien verankern können. Die am Anfang noch wasserdurchlässige Wand der PU-Röhre war nach der Fibroblastenbeschichtung vollständig mit Fibroblasten durchsetzt und wasserdicht.

4.2.1 Beschichtung von 4 mm PU-Röhren

Die Zellbesiedelung von künstlichen Gefäßen mit einem Durchmesser von 2-6 mm ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden (*Fernandez et al. 01; Giudiceandrea et al. 98; Kadletz et al. 87; Vohra et al. 90; Vohra et al. 92; Laube et al. 00; Kaehler et al. 89*). Bei diesen Versuchen wurde die zu besiedelnde Röhre langsam axial gedreht mit Ruhephasen von unterschiedlicher Dauer über verschiedene Zeiträume. Zellen in einer Zellsuspension setzten sich auf dem Untergrund entsprechend der Schwerkraft ab. Um die ganze Oberfläche mit

Zellen zu besiedeln war es erforderlich, die PU-Röhre um ihre eigene Längsachse langsam zu rotieren. Die Anhaftung an der Oberfläche geschieht durch einen aktiven Prozess, bei dem sich die Zelle mit Hilfe ihrer Zellausläufer, den Pseudopodien, in der Struktur der Oberfläche des PU-Grafts verankert. Dieser Prozess braucht Energie und Zeit zur Veränderung des Cytoskeletts. Nach den Erfahrungen aus der Literatur bei der Besiedelung von künstlichen Gefäßen beträgt die hierfür erforderliche Ruhephase für Endothelzellen zwischen 15 und 30 Minuten (*Consigny et al. 98; Eybl et al. 92; Fischlein et al. 96; Fischlein et al. 92; Kadletz et al. 87; Kent et al. 92; Plattner et al. 87*). Für Fibroblasten und glatte Muskelzellen ergaben sich in unseren Vorversuchen ähnliche Werte. Der Besiedlungserfolg war bei weniger als 15 Minuten Ruhephase deutlich schlechter und Ruhephasen länger als 30 Minuten brachten keinen Zugewinn.

Auf der Basis dieser Erfahrungen konzipierten wir das Besiedelungsgerät für die 4 mm PU-Grafts. Die Rotation um 405° sollte die nicht adhärenten Zellen wieder in der Zellsuspension im PU-Graft verteilen, damit sie dann an einem noch nicht besiedelten Ort sedimentieren und adhärieren. Um zu verhindern, dass sich die Zellen auf das ganze Medium im Beschichtungszylinder verteilten, wurden die Enden des 4 mm PU-Grafts verschlossen. Dies hatte den Nachteil, dass die Nährstoffzufuhr aus dem frischen Medium vermindert war. In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Zellen eine Beschichtungsdauer bis zu 2 Stunden tolerierten. Deshalb wählte man eine Ruhephase von 15 Minuten und eine Rotation um 405°, damit an möglichst vielen Stellen initiale Zellanhaftungen entstanden.

Die Beschichtungen für die Langzeitversuche und die ersten Perfusionen mit 4 mm PU-Grafts SB 63 hatten sehr gute Ergebnisse. Langzeitversuche zeigten, dass die 4 mm PU-Grafts nach Vorbeschichten mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen während der statischen Kulitivierung nicht zuwachsen und das Lumen offen bleibt (*Graf et al. 93; Nishiyama et al. 91*). Allerdings war am Ende des Versuchs die Ablösung des Endothelzellteppichs und die Auflösung des Fibroblastenverbandes deutlich zu sehen, was auf Apoptose durch mangelnde Belastung durch Shear Stress zurückzuführen ist (*Kaiser et al. 99*).

Nach den Versuchen stellte sich heraus, dass ein Teil der beschichteten 4 mm PU-Grafts aus einer Charge stammte, die mit Ethylenoxid sterilisiert worden war. Der Besiedlungserfolg war so schlecht, dass man auf die Perfusion verzichtet hat.

Zunächst vermuteten wir eine Kontamination mit Bakterien, die ebenfalls kugelförmige Auflagerungen erzeugt und den Zell-Layer zerstört (*Plattner et al. 87*). Da aber die mikrobiologischen Untersuchungen keinen Hinweis auf eine Kontamination mit Bakterien gaben, wurde der Hersteller der PU-Röhren konsultiert. Es ergab sich, dass die Chargen sich

in dem Sterilisationsverfahren unterschieden. Die Chargen SB 0063 wurden mit Gammastrahlen und die Chargen SB 0070 mit Ethylenoxid sterilisiert. Der Hersteller hatte dem Sterilisationsverfahren keine Bedeutung beigemessen, da die Charge ordnungsgemäß entgast worden war (*Star et al. 80*).

Um herauszufinden, ob es möglich ist, mit Ethylenoxid sterilisierte PU-Grafts mit Zellen zu besiedeln, haben wir eine kleine Versuchsreihe durchgeführt, die uns Aufschluss über die Eignung der mit Ethylenoxid sterilisierten PU-Grafts geben sollte. Die Versuchsreihe erhebt nicht den Anspruch einer exakten wissenschaftlichen Untersuchung. Deshalb reichte die makroskopische Bewertung der Ergebnisse aus den Versuchen mit den Patches zur Beurteilung aus (*Plattner et al. 87; Star et al. 80; Arizono et al. 94*).

4.2.2 Beschichtung von PU-Patches

Die Beschichtung von mehreren kleinen Patches oder kleinen Gewebestücken ist eine einfache Methode, verschiedene Einflüsse auf eine Zellkultur zu testen (*Fischlein et al. 92; Gulbins et al. 03a*). Es war nicht möglich gleichzeitig zwei ganze 4 mm PU-Röhren mit einer Zellkultur in dem von uns gewählten Verfahren zu beschichten.

4.2.3 Die Toxizität von Ethylenoxid auf für die beschichteten Zellkulturen

Im Ergebnis 3.2.3.2 konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten (*Star et al. 80; Arizono et al. 94*) und glatte Muskelzellen, die die Matrix für die Endothelzellen bilden sollten, auf Rückstände von Ethylenoxid mit Einstellung des Wachstums reagieren. Ethylenoxid führt zur Ablösung von schon angesiedelten Zellen, weil sie im direkten Kontakt mit den sterilisierten PU-Fäden stehen, und somit die größte Dosis an Ethylenoxid aufnehmen.

Im Ergebnis 3.2.3.3 wurden die Chargen SB 0063 und Chargen SB 0070, beide einmal ohne Spülung und einmal mit 30 Minuten Spülung verglichen. Ohne vorherige Spülung tritt auch bei der Charge SB 0063 eine leichte Behinderung des Wachstums für die Fibroblasten ein, die aber im Laufe der weiteren Kultivierung der Grafts ausgeglichen wird. Inwieweit dies nun Einfluss auf die Stabilität bei einer Shear Stress Exposition hat, bleibt noch abzuklären, zu vermuten ist eine verminderte Widerstandskraft.

In den Ergebnissen von 3.2.3.3.1 und 3.2.3.3.2 konnte gezeigt werden, dass sich bei der Charge SB 0070 ohne Spülung wie erwartet keine echte Zellbesiedelung entwickelte, weder bei den Fibroblasten noch bei der späteren Endothelbeschichtung. Dies spricht für die Notwendigkeit einer suffizienten Spülung vor Besiedelung.

Eine ausreichende Spülung der 4 mm PU-Grafts beider Sterilisationsverfahren brachte im Ergebnis 3.2.3.3.2 ein sehr gutes Fibroblastenwachstum. Auf der Charge SB 0070 waren vereinzelte kugelförmige Auflagerungen auf einem sonst intakten Fibroblasten Zell-Layer zu sehen, was auf eine vermehrte Produktion von Zellstoffwechselprodukten oder auf die Reste von apoptotischen Zellen hindeutet. Was genau sich hinter den kugelförmigen Objekten verbirgt, war in diesen Versuchen nicht herauszufinden. Jedenfalls war die Endothelzellbeschichtung nicht objektiv beeinträchtigt, es konnte in beiden 4 mm PU-Grafts ein konfluenter cobblestoneförmiger Endothelzell-Layer entstehen. Es bleibt offen, welchen Einfluss die Sterilisation mit Ethylenoxid auf die Widerstandskraft eines Tissue engineerten Endothelzell-Layers hat, der auf einem ausreichend gespülten PU-Graft angesiedelt worden ist. Klar zu erkennen ist, dass die Sterilisation mit Gammastrahlen bei PU-Grafts weniger Schwierigkeiten bereitet.

4.2.4 Beschichtung von 18 mm PU-Röhren

Die meisten Autoren in der Literatur beschreiben Beschichtungen von PTFE, CPU oder PU Grafts mit einem Durchmesser von 4 mm bis 6 mm (*Giudiceandrea et al. 98; Kent et al. 92; Miyata et al. 91; Rademacher et al. 01; Schneider et al. 97; Sentissi et al. 86; Vohra et al. 90; Vohra et al. 92; Zilla et al. 89; Kaehler et al. 89*), was, wie unter 4.2.1 beschrieben, eine einfache und standardisierte Methode darstellt.

Um aber in der Zukunft eine autologe Herzklappe auf einem aus PU gewebten Grundgerüst züchten zu können, war es notwendig ein Beschichtungsverfahren zu entwickeln, das für die wesentlich größere Fläche und Zellzahl geeignet ist.

Große Oberflächen und hohe Zellzahlen zeigten in den Vorversuchen bei dem horizontalen Rotationsbeschichtungsverfahren eine initiale schlechte Zellbesiedelung. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich die vielen Zellen in der Ruhephase alle zusammen absegmentieren, und sich bei der nächsten Rotation nicht wieder gut genug durchmischen. In der folgenden Ruhephase behinderten sich die Zellen bei der Anhaftung auf dem Untergrund.

Die Durchmischung der Zellsuspension bei der Beschichtung konnte durch ein Verfahren verbessert werden, das in unserem Labor für die Beschichtung von Herzklappen verwendet wird (*Gulbins et al. 03a; Gulbins et al. 03b*). Dieses Verfahren verbessert die initiale Zellbesiedelung auf großen PU- Röhren und ist das Beschichtungsverfahren der Wahl für eine komplexe Beschichtung von Herzklappen.

4.3 Perfusion und Adaptation der Endothelzellen an Scherkräfte

Die Kultivierung von Endothelzellen unter statischen Bedingungen ändert nicht nur das morphologische Erscheinungsbild bis hin zum typischen Bild des Cobblestonelayers, sondern auch den Zellstoffwechsel (*Ballermann et al. 98, Davies et al. 93, Galbusera et al. 97; Thoumine et al. 95, Vohra et al. 90*). Dies führt dazu, dass die Fähigkeit dem durch die Strömung des Blutes ausgeübter Scherkraft zu widerstehen, nachlässt (*Prendiville et al. 91; Salacinski et al. 00*). Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Endothelzellen in höheren Passagen des Kultivierens Apoptose auftrat (*Kaiser et al. 99*).

Um die Kräfte, die im Kreislaufsystem des Menschen durch die Strömung des Blutes entstehen, berechnen und vergleichen zu können, verwendet man ein vereinfachtes Modell. Vereinfachend unterstellt man das Blut sei mit seinen zellulären Bestandteilen eine Newtonsche Flüssigkeit, welche in einem starren Rohrsystem eine laminare Rohrströmung erzeugt. Weiter wird eine Renoldszahl von unter 2000 angenommen und eine mögliche Verwirbelung vernachlässigt. Wenn man das Kreislaufsystem so betrachtet kann man von einer mittleren Scherkraft von 5-20 $^{dym}/_{cm^2}$ (*Fischer et al. 01*) ausgehen, die auf die Endothelzellen wirkt.

Die meisten Arbeitsgruppen, die ihre Tissue engineerten Gefäßprothesen perfundiert haben, erzeugten einen pulsatilen Fluss, der im Vergleich zum kontinuierlichen Fluss eine stärkere Veränderung der Zellen bewirkt (*Helmlinger at al. 91*).

Häufig verwendet wurde M 199 als Perfusionslösung, das eine Viskosität von ca. 0,0108 Poise hatte. Blut hat eine Viskosität von etwa 0,035 Poise. Daraus folgt, dass man nach der Formel (Siehe 3.3) mit dem dreifachen Volumen der Perfusionslösung M 199 gegenüber Blut perfundieren muss, um rechnerisch die selbe Scherkraft wie in vivo zu erreichen. Wenn man bedenkt, dass die Viskosität des Blutes bei einer Verringerung der Scherkraft (Schubspannung) zunimmt, was hauptsächlich auf einer Aggregation der Erythrozyten beruht, dann erscheint es nicht realistisch, Bedingungen wie sie in vivo herrschen auch in vitro simulieren zu können. Dies beruht hauptsächlich auf der Tatsache, dass Blut keine ideale Newton`sche Flüssigkeit ist.

Um aber genügend Erfahrung und Wissen für einen möglichen Versuch in vivo zu erwerben, entwickelten wir Perfusionsbedingungen, welche durch den so erzeugten Scherkräften nachweislich die Anhaftung und Ausrichtung der Zellen sowie die Synthese von Proteinen der Endothelzellen beeinflussen konnten. Unter diesen Perfusionsbedingungen war der Frage nachzugehen, welche Zeit statisch kultivierte Zellen benötigen, um sich an die Scherkraft zu

gewöhnen. Die Ergebnisse sind aussagekräftig in Bezug auf die Adaptation der Zellen an Scherkräfte unter den eingeschränkten Voraussetzungen der in vitro Perfusion.

Die meisten Arbeiten untersuchten Endothelzellen bei einer rechnerischen mittleren Scherkraft von 2- 15 $^{dym}/_{cm^2}$ (*Giudiceandrea et al. 98; Kadletz et al. 87; Miyata et al. 91; Rademacher et al. 01; Schneider et al. 97; Vohra et al. 90*).

Es konnte gezeigt werden, dass eine höhere Scherkraft auch einen höheren Endothelzellverlust zur Folge hatte (*Kadletz et al. 87; Vohra et al. 90*). Bei der Adaptation von Endothelzellen an die Scherkraft lösten sich die meisten Zellen in den ersten 20 Minuten, nach 150 Minuten war keine signifikante Ablösung von Endothelzellen mehr zu erwarten (*Giudiceandrea et al. 98*).

Um die initiale Endothelzellanhaftung bei Perfusionsbeginn zu erhöhen, wurden Endothelzellen unter einer geringen Scherkraft auf einen Graft beschichtet (*Rademacher et al. 01; Sodian et al. 01*) und kultiviert, oder der Graft nach einer statischen Beschichtung mit den Endothelzellen in einem Perfusionssystem bei geringem Shear Stress zur Konfluenz kultiviert (*Mueller-Glauser et al. 93*). Beide Verfahren zeigten eine deutlich bessere Anhaftung der Endothelzellen auf den preclottet Grafts als die Vergleichsgruppen, in denen eine statisch beschichtete Kultur perfundiert wurde.

Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass Endothelzellen, die heute routinemäßig unter statischen Bedingungen gewonnen und kultiviert werden, sich unter bestimmten Bedingungen an die Scherkraft anpassen können. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Zellen so früh wie möglich wieder an die Scherkraft gewöhnt werden. Die Beschichtung oder Kultivierung unter Scherkräften erfordert einen enormen technischen Aufwand, der das Verfahren durch viele Schnittstellen sehr anfällig für Störungen und Infektionen macht.

Unser Ziel war es daher, unter statischen Bedingungen den Graft mit Zellen zu beschichten, diese zur Konfluenz zu kultivieren und dann in einer möglichst kurzen Zeit die Endothelzellen wieder an die Scherkarft zu gewöhnen. Unsere Beobachtung, dass nach einer Adaptationsphase die Zell-Layer stabil blieben, deckte sich mit den Veröffentlichungen in der Literatur (*Consigny P.M. et al. 98; Moinudden et al. 98*), in der beschrieben wird, dass eine verzögerte Exposition gegenüber Scherkraft zu einem besseren Überleben des Endothels führt. Diese Gewöhnungszeit nannten wir Vorlaufzeit, in der wir langsam die Scherkraft exponentiell auf den Sollwert steigerten.

Die PU-Grafts mit einem kleinen Durchmesser haben einen entscheidenden Nachteil, wenn es darum geht, den von einem pulsatilen Fluss verursachten Scherkräften in einer vorgegebenen Zeit exponentiell zu steigern.

Bei dem pulsatilen Fluss liegt der maximale Scherkraft genau in der Austreibephase der Rollerpumpe, mit einem sehr schnell ansteigenden Peak. Diesen starken Anstieg des Scherkraft wollten wir in der Vorlaufzeit vermeiden. Dies gelang nur mit den 18 mm PU-Grafts, in der die Scherkraft bei einem Anstieg des Durchflusses geringer ausfällt als bei Röhren mit kleinerem Durchmesser. Dies liegt zum einem an dem Durchmesser und zum anderen an der Viskosität der Perfusionslösung (siehe Formel unter 2.3.3).
Von Vorteil war, dass für die Untersuchung größere Flächen zur Verfügung standen, was eine bessere Beurteilung ermöglicht und die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse erhöht. Störfaktoren wie z.B. kleine Fehler beim Einnähen der Grafts wirken sich nicht so stark auf das Ergebnis aus wie das bei den 4 mm PU-Grafts der Fall ist.

4.3.1 Einfluss der Vorlaufzeit auf die Adaptation der Zellkulturen an die Scherkraft

Bei den Vorlaufzeiten von 0 und 15 Minuten zeigte sich im REM ein eindeutiger Verlust des ehemaligen konfluenten Endothelzell-Layers in allen Proben. Es gab in einzelnen Proben noch Felder, in denen Endothelzellen zu sehen waren, diese hatten sich wie schon in der Literatur beschrieben (*Ballermann et al. 98, Helmlinger et al. 91*), von dem Cobblestonemuster hin zu einem länglichen, in eine Richtung weisende Zellstruktur gewandelt. Der Großteil des Zell-Layers, der zu sehen war, wurde von den Fibroblasten gebildet, die sich in der Wand der PU-Röhre mit Hilfe ihrer Podozyten fest verankert hatten und auch nach der Perfusion noch eine feste Matrix bildeten. Die Immunhistologie bestätigte den Eindruck aus dem REM, der Fibroblastennachweis war positiv bis hoch positiv und bestätigte, dass die Grundlage aus Fibroblasten, mit Hilfe ihrer Verankerungen im Gewebe, die Perfusion unbeschadet überstanden hatten. Der Nachweis von Collagen IV für die Basalmembran, CD 31 und Faktor VIII als Endothelnachweis war nur vereinzelt möglich und zeigte, dass an den Stellen, an denen Endothelzellen noch vorhanden waren, auch vermehrt Collagen IV und Faktor VIII produziert worden war.
Die Ergebnisse mit 30 Minuten Vorlauf waren sehr stark unterschiedlich. In der einen Probe wurde fast die Hälfte des zusammenhängenden Endothelzell-Layers bis auf die Fibroblasten zerstört. In der anderen Probe gab es einen zusammenhängenden Endothelzell-Layer, der vernachlässigende Defekte besaß. Der Endothelzell-Layer hatte sich in seiner Struktur und Ausrichtung der Scherkraft angepasst. Die Immunhistologie bestätigt dies. Die Fibroblasten konnten dort am besten angefärbt werden, wo sich weniger Endothelzellen befanden. Der Nachweis von CD 31 und Faktor VIII für die Endothelzellen war dafür in den anderen Proben sehr deutlich, genauso wie der Nachweis von Collagen IV für die Basalmembran. Auch

konnte hier eNOS, das die Endothelzellen bei der Anpassung an Scherkraft produzieren, vereinzelt nachgewiesen werden. Auffallend war bei den beiden extremen Ergebnissen, dass eine Probe nur die Hälfte des Durchschnitts an Endothelzellen pro cm² aufwies. Diese Probe brauchte 10 Tage länger zur Kultivierung als der Durchschnitt. Der andere Graft wurde dagegen mit fast 40% mehr Endothelzellen wie der Durchschnitt beschichtet. Dies lässt den Rückschluss zu, dass es sich bei der einen Probe um eine doch schwache Zellkultur handelte und bei der anderen um eine sehr starke Zellkultur. Bei der Beschichtung der schwachen Kultur haben sich viele schwache präapoptoische Endothelzellen in dem Endothelzell-Layer mit ansiedeln können, die nicht die Widerstandsfähigkeit der durchschnittlichen Endothelzellkulturen besaßen.

Die Ergebnisse bei den Versuchen mit 45 und 60 Minuten Vorlauf waren durchweg positiv. Es zeigte sich eine deutliche Anpassung der Endothelzellen an die Scherkraft. Zwar gab es auch vereinzelte Defekte in dem Endothelzell-Layer, die aber max. 10% der Oberfläche ausmachten. So etwas kann der menschliche Körper selbständig regenerieren (*Pearson et al. 99*). Die Immunhistologie bestätigte in allen Punkten die Erwartungen aus den REM-Bildern. Der Fibroblasten und Endothelzellnachweis war positiv bzw. hoch positiv, ebenso Faktor VIII und Collagen IV. Auch eNOS konnte vereinzelt nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass alle Endothelzellkulturen, die 45 oder 60 Minuten Vorlauf hatten, ausreichend an die Scherkräfte gewöhnt werden konnten.

4.3.2 Perfusion der 4 mm Grafts SB 63 mit 30 Minuten Vorlauf

Die Ergebnisse von 3.3.3 sind durchweg positiv zu bewerten. Man sieht in 3 Proben eine deutliche Anpassung an die Scherkraft bei einem als intakt zu wertenden Endothelzell-Layer. Die Probe mit kugeligen Zellen, die unverändert erscheint, muss wohl als misslungener Versuch gewertet werden, bei dem die initiale Beschichtung nicht erfolgreich gewesen ist und die Perfusion nicht richtig funktioniert hat, da keine Spuren von Scherkraft an den Zellen zusehen sind. Es ist möglich, dass die Anastomose in diesem Fall nicht suffizient genug war, und deshalb nicht genügend Fluss durch den Graft strömen konnte.

Aber bei Betrachtung der drei anderen Proben ist zu sagen, dass sie sehr gut zu den Ergebnissen der 18 mm PU-Grafts passen, und die Feststellung bestätigen, dass statische Endothelzellkulturen auf einer Zellmatrix aus Fibroblasten und glatten Muskelzellen nach einer kurzen Gewöhnungsphase Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherkräften erlangen können.

5. Zusammenfassung

Nach der Entwicklung von Methoden zur Kultivierung von Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und zur Besiedelung von PU-Grafts in unserem Labor unter Leitung von PD Dr. Gulbins, konnte auf die Methoden in der vorliegenden Arbeit erfolgreich aufgebaut werden.

Es hat sich gezeigt, dass die Sterilisation der 4mm PU-Grafts mit Gammastrahlen oder mit Ethylenoxid einen entscheidenden Einfluß auf den Erfolg der Besiedelung hat. Reste von Ethylenoxid wirken auf die Zellen toxisch und beeinträchtigen die Besiedelung der PU-Grafts oder machen sie unmöglich.

Mit dem eigens für diese Untersuchung entwickelten Perfusionssystem zeigte sich, dass sich die statisch kultivierten Endothelzellen ablösen, wenn sie sofort ohne Vorlaufzeit der vollen Scherkraft („Shear Stress“) ausgesetzt werden. Daraus folgt, dass die Endothelzellen ihre Widerstandskraft gegenüber der Scherkraft während der Kultivierung eingebüßt hatten. Die Versuche mit unterschiedlich langen Adaptationsphasen, in denen der anfangs geringe Durchfluss und niedrige Druck exponentiell auf die Zielwerte gesteigert wurde, zeigte, dass eine langsame Konditionierung der Endothelzellen über 30 Minuten an die Scherkraft eine deutliche Verbesserung der Widerstandsfähigkeit bewirkt. Nach den 30 Minuten Gewöhnungszeit konnte keine signifikante Verbesserung mehr erzielt werden.

Somit lässt sich abschließend sagen, dass statisch kultivierte und besiedelte Endothelzellkulturen auf einer natürlichen Grundlage aus Fibroblasten, nach einer gewissen Gewöhnungszeit ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherkraft, die sie während der statischen Kultivierung verloren hatten, wiedererlangen können.

6. Literaturverzeichnis

Arizono T., Iwamoto Y., Okuyama K., Sugioka Y.: Ethylene oxide sterilization if bone grafts. Residual gas concentration and fibroblast toxicity. Acta Orthop Scand 1994, 65: 640-642

Arom K.V., Emery R.W., Nicoloff D.M., Petersen R.J.: Anticoagulant related complications in elderly patients with St. Jude mechanical valve protheses. J Heart Valve Dis. 1996, 5: 505-510

Ballermann B.J.,Dardik A., Eng E, Liu A.: Shear stress and the endothelium. Kidney Int Suppl. 1998, 67: S100-108

Bengtsson L.A., Radegran K., Haegerstrand A.: A new and simple technique to achieve aconfluent and flow resistant endothelium on vascular ePTFE-grafts using human serum. Eur J Vasc Surg. 1994, 8: 182-187

Boyer M., Townsend L.E., Vogel L.M., Falk J., Reitz-Vick D., Tevor K., Villalba M., Bendick P.J., Glover J.L.: Isolation of endothelial cells and theit progenitor cells from human peripheral blood. J Vasc Surg. 2000, 31: 181-189

Consigny P.M., Vitali N.J.: Resistance of freshly adherent endothelial cells to detachment by shear stress is matrix and time dependent. J Vasc Interv Radiol. 1998, 9: 479-485

Darnell J., Lodish H., Baltimore D.: Molecular Cell Biology. Scientific American Books, 1990: Chapter 23

Davies M.G., Hagen P.O.: The vascular endothelium. Ann Surg. 1993, 218: 593-609

Deutsch M., Meinhart J., Vesely M., Fischlein T., Groscurth P., Oppell U., Zilla P.: In vitro endothelialization of expanded polytetrafluoroethylene grafts: A clinical case report after 41 months of implantation. J Vasc Surg 1997, 25: 757-763

Dike L.E., Farmer S.R.: Cell adhesion induces expression of growth-associated genes in suspension-arrestesd fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85: 6792-6796

Eybl E., Grimm M., Grabenwöger M., Böck P., Müller M.M., Wolner E.: Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials. J Thorac Cardiovasc Surg 1992, 104: 763-769

Fernandez P., Bareille R., Conrad V., Midy D., Bordenave L.: Evaluation of an in vitro endothelialized vascular graft under pulsatile shear stress with a novel radiolabeling procedure. Biomat. 2001, 22: 649-658

Fischlein T., Fasol R.: In vitro endothelialization of bioprothetic heart valves. J Heart Valve Dis. 1996, 5: 58-65

Fischlein T., Lehner G., Lante W., Fittkau M., Murphy J.G., Weinhold C., Reichart B.: Endothelialization of cardiac bioprostheses. Int Artif Organs 1994, 17: 345-352

Fischlein T., Lehner G., Lante W., Reichart B.: Endothelialization of aldehyde-fixed cardiac valve bioprotheses. Transplant Proc. 1992, 6: 2988

Fisher A.B., Shu Chien, Barakat A.I., Nerem R.M.: Endothelial cellular response to altered shear stress. AJP-Lung Cell Mol Physiol 2001. 281: 529-533

Galbusera M., Zoja C., Donadelli R., Paris S., Morigi M., Benigni A., Figliuzzi M., Remuzzi G., Remuzzi A.: Fluid shear stress modulates von Willebrand factor release from human vascular endothelium. Blood 1997, 90: 1558-1564

Giudiceandrea A., Seifalian A.M., Krijgsman B., Hamilton G.: Effect of prolonged pulsatile shear stress in vitro on endothelial cell seeded PTFE and compliant polyurethane vascular grafts. Eur J Endovasc Surg. 1998, 15: 147-154

Graf H.: Endothelial control of cell migration and proliferation. Eur Heart Journal 1993, 14: 183-186

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

Gulbins H., Goldemund A., Uhlig A., Meiser B., Reichart B.: Implantation of an autologously endothelialized homograft. J Thorac Cardiovasc Surg 2003 b, 126: 890-891

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

Helmlinger G., Geiger R.V., Schreck S., Nerem R.M.: Effeckts of Pulsatile Flow on Cultured Vascular Endothelial Cell Morphology. J Biomechanical Engineering 1991, 113: 123-131

Hoffman D., Gong G., Liao K., Macaluso F., Nikolic S.D., Frater R.W.: Spontaneous host endothelial growth on bioprotheses. Influence of fixation. Circulation 1992, 86 (5 Suppl): II 75-79

Hormia M., Letho V.-P., Virtanen I.: Factor VIII-related Antigen. A pericellular matrix component of cultured human endothelial cells. Exp. Cell Res. 1983; 149: 483-497

Jaffe E.A., Minick C.R., Adelman B., Becker C.G., Nachman R.: Synthesis of basement membrane collagen by cultured human endothelial cells. J Exp Med. 1976, 144: 209-225

Jaffe E.A., Mosher D.F.: Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. J Exp Med. 1978, 147: 1779-1791

Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R.: Culture of human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. Identification by Morphologic and Immunologic Criteria. J Clin Invest. 1973, 52: 2745-2756

Jansson K., Bengtsson L., Swedenborg J., Haegerstrand A.N.: In vitro endothelialization of bioprosthetic heart valves provides an endothelial cell monolayer with proliferative capacities and resistance to pulsatile flow. J Thorac Cardiovasc Surg. 2001, 121: 108-115

Kadletz M., Moser R., Preiss P., Deutsch M., Zilla P., Fasol R.: In vitro lining of fibronectin coated PFTE grafts with cryopreserved saphenous vein endothelial cells. Thorac Cardiovasc Surg. 1987, 35: 143-147

Kaehler J., Zilla P., Fasol R., Deutsch M., Kadletz M.: Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts. J Vasc Surg 1989, 9: 535-541

Kaiser D., Freyberg M.A., Schrimpf G., Friedl P.: Apoptosis induced by lack of hemodynamic forces is a general endothelial feature even occuring in immortalized cell lines. Endothelium. 1999, 6: 325-334

Kan M., Kato M., Yamane I.: Long-term serial cultivation and growth requirements for human umbilical vein endothelial cells. In Vitro Cell Dev Biol. 1985, 21: 181-188

Kent K.C., Oshima A., Whittemore A.D.: Optimal seeding conditions for human endothelial cells. Ann Vasc Surg. 1992, 6: 258-264

Kirkpatrick C.J., Kampe M., Fischer E.G., 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 : 221-225

L`Heureux N., Paquet S., Labbe`R., Germain L., Auger F.A.: A completely biological tissue-engineered human blood vessel. FASEB J 1998, 12: 47-56

Laube H.R., Duwe J., Rutsch W., Konertz W.: Clinical Experience with autologous Endothelial Cell-Seeded Polyterafluoroethylene Coronary Artery Bypass Grafts. J Thorac Cardiovasc Surg 2000, 120: 134-141

Lee Y.-S., Park D.K., Kim Y.B., Seo J.W., Lee K.B., Min B.G.: Endothelial cell seeding onto the extracellular matrix of fibroblasts for the development of a small diameter polyurethane vessel. ASAIO J. 1993, 39: M 740-745

Leseche G., Bikfalvi A., Dupuy E., Tobelem G., Andreassian B., Caen J.: Prelining of polytetrafluoroethylene grafts with cultured human endothelial cells isolated from varicose veins. Surgery 1989, 105: 36-45

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

Miyata T., Conte M.S., Trudelli L.A., Mason D., Whittemore A.D., Birinyi L.K.: Delayed exposure to pulsatile shear stress improves retention of human saphenous vein endothelial cells on seede ePTFE grafts. J Surg Res. 1991, 50: 485-493

Mueller-Glauser W., Zilla P., Lachat M., Bisang B., Rieser F., Segesse L., Turina M.:Immediate shear stress resistance of endothelial cell monolayers seeded in vitro on fibrin glue-coated ePTFE prostheses. Eur J Vasc Surg. 1993, 7: 324-328

Nishiyama T., Akutsu N., Horii O., Nakayama Y., Ozawa T., Hayashi T.: Response to growth factors of human dermal fibroblasts in a quiescent state owing to cell-matrix contact inhibition. Matrix. 1991, 11: 71-75

Ombrellaro M.P., Stevens S.L., Sciarrotta J., Schaeffer D., Freeman M.B., Goldman M.H.: Effect of Intra-arterila Environment on Endothelialization and Basement Membrane Organization in Polytetrafluoroethylene Grafts. American J of Surgery 1997, 174: 29-32

Pearson J.D.: Endothelial cell function and thrombosis. Bailleres Best Pract Res Clin Haematol. 1999, 12: 329-341

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

Poole- Warren L.A., Schindhelm K., Graham A.R., Slowiaczek P.R., Nobler K.R.: Performance of small diameter synthetic vascular protheses with confluent autologous endothelial cell linings. J Biomed Mater Res 1996, 30: 221-229

Prendiville E.J., Coleman J.E., Callow A.D., Gould K.E., Laliberte-Verdon S., Ramberg K., Connolly R.J: Increased in- vitro incubation time of endothelial cells on fibronectin-treated ePTFE increases cell retention in blood flow. Eur J Vasc Surg. 1991, 5: 311-319

Rademacher A., Paulitschke M., Meyer R., Hetzer R.: Endothelialization of PTFE vascular grafts under flow induces significant cell changes. Int J Artif Organs. 2001, 24: 235-242

Salacinski H.J., Tai N.R., Punshon G., Giudiceandrea A., Hamilton G., Seifalian A.M.: Optimal endotheliasation of a new compliant poly(carbonate- urea)urethane vascular graft with effect of physiological shear stress. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2000: 20: 342-352

Schneider A., Chandra M., Lazarovici G., Vlodavsky I., Merin G., Uretzky G., Borman J.B., Schwalb H.: Naturally produced extracellular matrix is an excellent substrate for canine endothelial cell proliferation and resistance to shear stress on PTFE vascular grafts. Thromb Haemost. 1997, 78: 1392-1398

Sentissi J.M., Ramberg K., O`Donnell T.F., Conolly R.J., Callow A.D.: The effect of flow on vascular endothelial cells grown in tissue culture on polytetrafluoroethylene grafts. Surgery. 1986, 99: 337-343

Sodian R., Lemke T., Loebe M., Hoerstrup S.P., Potapov E., Hausmann H., Meyer R., Hetzer R.: New pulsatile bioreactor for fabrication of tissue-engineered patches. Appl Biomater. 2001, 58: 401-405

Star E.G.: Mutagenic and cytotoxic effect of ethylene oxide on human cell cultures. Zentralnl Bakteriol 1980, 170: 548-556

Strehl R., Schumacher K., De Vries U., Minuth W.W.: Proliferating cells vs differentiated cells in tissue engineering. Tissue Eng. 2002, 8: 37-42

Terramani T.T., Eton D., Bui P.A., Wang Y., Weaver F.A., Yu H.: Human macrovascular endothelial cells: optimization of culture conditions. In Vitro Cell Dev Anim 2000, 36: 125-132

Thompson M., 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

Thoumine O., Nerem R.M., Girard P.: Changes in organization and composition of the extracellular matrix underlying cultured endothelial cells exposed to laminar steady shear stress. Lab Invest. 1995, 73: 565-576

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

Vohra R.K., Thomson G.J.L., Sharma H., Carr H.M.H., Walker M.G.: Effects of shear stress on endothelial cell monolayers on expanded polytetrafluorethylene (ePTFE) grafts using preclot and fibronectin matrices. Eur J Vasc Surg. 1990, 31-41

Vohra R.K., Thomson G.J.L., Sharma H., Carr H.M.H., Walker M.G.: The response of rapidly formed adult human endothelial-cell monolayers to shear stress of flow: a comparison of fibronectin-coated teflon and gelatin-impregnated dacron grafts. Surgery. 1992, 111: 210-220

Walluschek K.P., Steinhoff G., Haverich A.: Endothelial cell seeding of native vascular surfaces. Eur J Vasc Endovasc Surg. 1996, 11: 290-303

Wen SJ., Zhao LM., Li P., Li JX., Liu Y., Liu JL., Chen YC.: Blood vessel tissue engineering: seeding vascular smooth muscle cells and Endothelial cells sequentially on biodegradable scaffold in vitro. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2005 Mar 30; 85(12): 816-8.

Wu X., Rabkin-Aikawa E., Guleserian K.J., Perry T.E., Masuda Y., Sutherland F.W., Schoen F.J., Mayer J.E., Bischoff J.: Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004, 287: 480-487

Zilla P., Fasol R., Preiss P., Kadletz M., Deutsch M., Shima H., Tsangaris S., Groscurth P.: Use of fibrin glue as a substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts. Surgery 1989, 105: 515-522

Zünd G., Hoerstrup S.P., Schoeberlein A., Lachat M., Uhlschmidt G., Vogt P.R., Turina M.: Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery: seeding of human fibroblast followed by human endothelial cells on resorbable mesh. Eur J Cardiothorac Surg. 1998, 13: 160-164

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Geboren am 10.10.1976 in Stuttgart
Eltern: Brigitte und Dr. (jur.) Ludwig Pätzold
Adresse: Königinstr 83 80439 München

AUSBILDUNGSDATEN

1989-1994 Realschule Korntal Münchingen, Realschulabschluss

1994-1997 Technisches Gymnasium Leonberg, Allgemeine Hochschulreife

1997-1998 Zivildienst und Ausbildung zum Rettungssanitäter

1998-1999 Technische Universität Karlsruhe, ein Semester Studium Wirtschaftsingenieurwesen

1999 - Ludwig Maximilian Universität München, Beginn des Studiums der Medizin

2001	März	Physikum
2002	März	1.Staatsexamen
	August	Studentenaustausch des Instituts für Japanologie München mit Tokio
2004	März	2.Staatsexamen
	Mai	Weltreise bis Oktober 04
- 2005	13.12.05	3. Staatsexamen

BERUFSPRAXIS

1997-1998 Zivildienst als Rettungssanitäter,
Rettung- und Krankentransport des DRK Stuttgart e.V.

1999-2003 Semesterferienarbeitsverträge als Rettungssanitäter,
Rettung- und Krankentransport des DRK Stuttgart e.V.

1999-2002 Studentische Hilfskraft als Anästhesiehelfer,
Anästhesiologische Gemeinschaftspraxis im Helios München.

2003- 2005 Werksstudentenvertrag bei der Deutschen Stiftung für Organtransplantation Region Bayern als Perfusionist bei Organentnahmen.

Seit 2006 Assistensarzt in der Unfallchirurgie der Berufgenossenschaflichen Unfallklinik Murnau