

Fibringel als Scaffold für das Tissue Engineering von Herzklappen

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Christian Gabriel Cornelissen

aus Köln

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Dipl.-Ing. Thomas Schmitz-Rohde
Herr Universitätsprofessor
Dr. med. (Zürich) Bruno J. Messmer

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Dezember 2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Anatomie und Physiologie der Herzklappen	3
2.1	Embryogenese der Herzklappen	3
2.2	Anatomie	5
2.2.1	Makroskopische Anatomie	5
2.2.2	Mikroskopische Anatomie	9
2.3	Physiologie	12
2.4	Pathophysiologie	18
2.4.1	Erworbene Klappenfehler	19
2.4.1.1	Degenerative, calcifizierende Aortens- tenose	19
2.4.1.2	Infektiöse Endokarditis	20
2.4.2	Angeborene Klappenfehler	21
2.4.2.1	Valvuläre Obstruktionen im Bereich des rechten Herzens	22
2.4.2.2	Valvuläre Obstruktionen im Bereich des linken Herzens	24
3	Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings	27
3.1	Prinzipien des Tissue Engineerings	27
3.2	Klinischer Hintergrund des valvulären Tissue Enginee- rings	28
3.2.1	Mechanische Klappenprothesen	29

3.2.2	Xenografts	29
3.2.3	Homografts	31
3.2.4	Definition des idealen Klappenersatzes	33
3.3	Historische Entwicklung des Tissue Engineerings	33
3.4	Komponenten des Cardiovasculären Tissue Engineerings	36
3.4.1	Zelluläre Komponenten	36
3.4.2	Scaffolds	38
3.4.2.1	Acellularisierte Matrices	39
3.4.2.2	Synthetische Polymere	42
3.4.2.3	Biologische Polymere	45
3.4.2.4	Zellbesiedlung	47
3.4.3	Bioreaktoren	48
3.4.3.1	Notwendigkeit von Bioreaktoren	48
3.4.3.2	Anforderungen an Bioreaktoren	50
3.4.3.3	Statische Kulturmethoden	50
3.4.3.4	Dynamische Kulturmethoden für cardiovascularäre Strukturen	51
3.4.3.5	Bioreaktorsysteme für das valvuläre Tissue Engineering	53
3.4.3.6	Vergleich der Bioreaktorsysteme für Herzklappen	56

4 Optimierung des Tissue Engineerings von Herzklappen auf Fibringelbasis 59

4.1	Weiterentwicklung des Gußprozesses	62
4.1.1	Zielsetzungen	62
4.1.2	Prototyp des Gussverfahrens	63
4.1.3	Weiterentwicklung der Gusskammer	64
4.1.4	Weiterentwicklung der Gussstempel	67
4.2	Endothelzellbesiedlung	70
4.3	Bioreaktorentwicklung	74

4.3.1	Zielsetzungen	74
4.3.2	Bioreaktor Version I	74
4.3.3	Bioreaktor Version II	78
5	Material und Methoden	81
5.1	Anlage der Primärkulturen	81
5.2	Amplifikationskultur	84
5.3	Fibringelherstellung	85
5.3.1	Gewinnung von autologem Fibrinogen	85
5.3.1.1	Gewinnung von Plättchenfreiem Plasma (PFP)	85
5.3.1.2	Gewinnung von Fibrinogen aus Plättchenfreiem Plasma	86
5.3.2	Ansetzen von industriell isoliertem Humanfibrinogen	87
5.3.3	Gießen von Fibringelen	87
5.4	Kultur im Bioreaktorsystem	88
5.4.1	Evaluation verschiedener Kulturbedingungen	89
5.4.2	Analyse der Gewebeentwicklung	91
5.4.3	Kultur unter optimierten Bedingungen	91
5.5	Herstellung von Paraffinschnitten	92
5.6	HE-Färbung (nach [73])	93
5.7	Gomoris Trichrome Färbung (nach [74])	94
5.8	Immunhistochemie	95
5.9	Verwendete Chemikalien	98
5.10	Verwendete Materialien	101
5.11	Verwendete Geräte	102
6	Ergebnisse	103
6.1	Entwicklung des Gewebes über 30 Tage	103
6.2	Schlagfrequenz	107
6.3	Zellzahl	110

6.4	Befestigungsmöglichkeiten	112
6.5	Druckdifferenz	114
6.6	Fibrinogenkonzentration	117
6.7	Optimierte Kulturbedingungen	118
6.7.1	Qualität des Mediums	120
6.7.2	Makroskopischer Aspekt	120
6.7.3	Konventionelle Histologie	122
6.7.4	Immunhistochemie	124
7	Diskussion	133
7.1	Weiterentwicklung des Gußverfahrens	133
7.2	Bioreaktorentwicklung	138
7.3	Kulturbedingungen im Bioreaktor	145
7.3.1	Einfluß der Zusammensetzung des Scaffolds	145
7.3.2	Einfluß der zellulären Komponenten	146
7.3.3	Einfluß der Kulturbedingungen im Bioreaktor- system	147
7.3.4	Gesamtbeurteilung	149
7.4	Gewebeentwicklung, Histologie	150
8	Zusammenfassung	155

Abkürzungsverzeichnis

Maßeinheiten

°C – Grad Celcius

cm – Zentimeter

dl – Deziliter

mmHg – Millimeter Quecksilbersäule

cmH₂O – Zentimeter Wassersäule

g – Gravitationskonstante

g – Gramm

KIU – 1000 Internationale Einheiten

kN – 1000 Newton

m² – Quadratmeter

min – Minute

mg – Milligramm

mL – Milliliter

mm – Millimeter

mM – millimolar

mmol – Millimol

pCO₂ – Kohlendioxidpartialdruck

pH – Wasserstoffionenkonzentration

pO₂ – Sauerstoffpartialdruck

U – Einheiten

μm – Mikrometer

Stoffe

α -SMA – Alpha-Smooth-Muscle-Actin

Aqua dest. – destilliertes Wasser

CaCl₂ – Calciumchlorid

CO₂ – Kohlendioxid

DAPI – 2-(4-carbamimidoylphenyl)-1H-indol-6-carboximidamid

DNA – Desoxyribonukleinsäure

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA – Ethylendiamintetraacetat

HCl – Salzsäure

KCl – Kaliumchlorid

NaCl – Kochsalz

O₂ – Sauerstoff

PBS – Phosphate buffered saline

PFP – Plättchenfreies Plasma

PGA – Polyglykolsäure

PMMA – Polymethylmethacrylat

POM – Polyoxymethylen

PVDF – Polyvinylidendifluorid

RNA – Ribonukleinsäure

Methoden

HE-Färbung – Hämatoxylin-Eosin-Färbung

RGB – rot - grün - blau

1 Einleitung

Krankheiten der menschlichen Herzklappen sind sowohl im Erwachsenen - wie auch im Kindesalter häufige Ereignisse, die oft zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Rekonstruktive Möglichkeiten haben den kompletten Ersatz einer Herzklappe zwar zum Teil ablösen können, aber dennoch bleibt der Austausch einer erkrankten Klappe nicht selten der einzige Weg zur Heilung.

Heutzutage werden zum Ersatz menschlicher Semilunarklappen, die oft durch congenitale und / oder erworbene Veränderungen betroffen sind, mechanische Klappen, Herzklappen aus Rinderpericard, komplette porcine Semilunarklappen oder menschliche Transplantate eingesetzt. Diese Arten des Herzklappenersatzes bringen spezifische Nachteile mit sich. Bei Kindern stellt die Notwendigkeit, die Patienten aufgrund mangelnden Wachstums der implantierten Herzklappen zu reoperieren, den wesentlichen Nachteil dieser Verfahren dar. Es ist daher notwendig, nach besseren Möglichkeiten des Herzklappenersatzes, insbesondere für Kinder, zu suchen.

Tissue-Engineering, das Züchten komplett körpereigener Gewebe in Kultur, bietet hier viel versprechende Ansätze: mit dieser Technik sollte es möglich sein, Herzklappen herzustellen, die den körpereigenen in allen Eigenschaften entsprechen, sich also gegenüber dem Blut nicht thrombogen zeigen, die Blutbestandteile nicht schädigen, sich in das umliegende Gewebe ohne Abstoßungsreaktion integrieren und durch Nutzen der körpereigenen Reparaturmechanismen den Belastungen im

1 Einleitung

menschlichen Körper lange standhalten. Außerdem sollten sie mit dem Körper eines Kindes mitwachsen und so Reoperationen verhindern.

Jockenhövel et al. haben ein Verfahren beschrieben, mit dem es möglich ist den Scaffold, die Grundlage für eine solche tissue-engineerte Klappe, mittels eines Spritzgussverfahrens aus dem patientenbluteigenen Fibrinogen, eingesetzt als Gel, herzustellen [42]. In dieses Grundgerüst können glatte Muskelzellen eingebracht werden, die *in vitro* natives Klappengewebe formen. Dieses Gewebe kann vor Implantation mit Endothelzellen beschichtet werden und entspricht dann einer natürlichen Semilunarklappe.

Ziel dieser Dissertation soll es sein, das von Jockenhövel et al. beschriebene Gussverfahren zu optimieren und ein auf die Anforderungen des Fibringelscaffolds abgestimmtes Bioreaktorsystem zu entwickeln, in dem die Klappen *in vitro* kultiviert und mit Endothelzellen beschichtet werden können.

2 Anatomie und Physiologie der Herzklappen

2.1 Embryogenese der Herzklappen

Bereits in der dritten Woche der Embryonalentwicklung beginnt sich das menschliche Herz zu kontrahieren [59]. Zu diesem Zeitpunkt besteht es allerdings lediglich aus einem Rohr ohne jeglichen Hinweis auf Herzklappen. Kurze Zeit später, ab einem Gestationsalter von 35

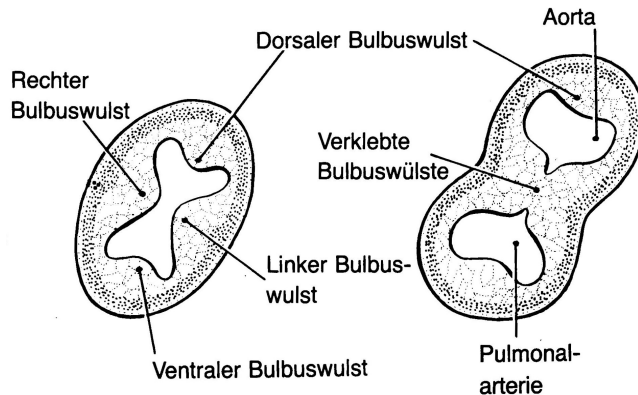


Abbildung 2.1: Unterteilung des primitiven Ausflusstraktes in Aorta und Pulmonalarterie [59]

Tagen, nimmt das Herz eine H-artige Form an und ermöglicht die Bildung von rechter und linker Herzkammer. Gleichzeitig bilden sich En-

2 Anatomie und Physiologie der Herzklappen

dokardkissen, die Bulbuswülste, an der Wand des primitiven Ausflusstraktes, die zum einen eine Scheidewand zwischen Aorta und Pulmonalarterie bilden (vgl. Abbildung 2.1) und zum anderen die erste Stufe der Entwicklung der Semilunarklappen darstellen (vgl. Abbildung 2.2). Bis zum Ende der siebten Gestationswoche entwickeln sich kurze und dicke Klappensegel, die innerhalb der 8. Woche dünner und graziler werden. Ab diesem Zeitpunkt findet nur noch Längenwachstum und Ausdünnung statt.

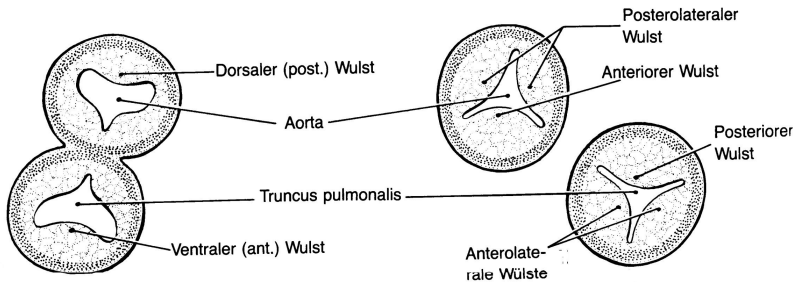


Abbildung 2.2: Ausbildung der Semilunarklappen [59]

Diese gesamte Entwicklung erfolgt wahrscheinlich unter hypoxischen Bedingungen von zunächst 30 und später 20 mmHg Sauerstoffpartialdruck bei Blutdruckverhältnissen unter 10 mmHg und bei Herzfrequenzen, die von etwa 65 Schlägen pro Minute über 100 Schläge pro Minute in der siebten Gestationswoche, in der die Klappen schon deutlich auszumachen sind, bis zu maximal 160 Schlägen pro Minute in der zwanzigsten Gestationswoche reichen [91].

2.2 Anatomie

2.2.1 Makroskopische Anatomie

Makroskopisch ähneln sich die Aorten- und Pulmonalklappe sehr stark. Deshalb folgt hier eine gemeinsame Beschreibung der Geometrie beider Semilunarklappen [33].

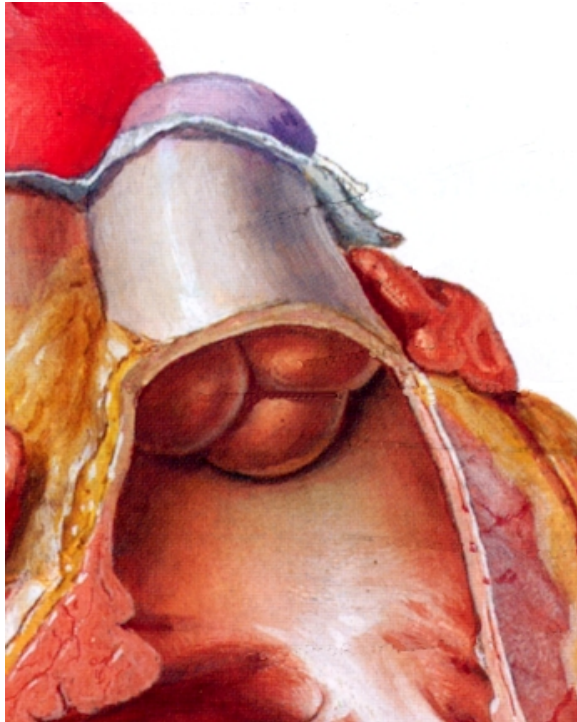


Abbildung 2.3: Einblick in den ventrikulären Ausführungstrakt [65]

Die Semilunarklappen sind der Übergang vom ventrikulären Ausflußtrakt zur Pulmonalarterie beziehungsweise zur Aorta [24] (vgl. Abbildung 2.3). Sie bestehen aus je drei halbmondförmigen Segeln, deren plane Oberkanten in das Lumen des Gefäßabschnittes hineinragen, während die geschwungene Basis mit der Gefäßwand verwachsen ist

2 Anatomie und Physiologie der Herzklappen

(vgl. Abbildung 2.4). Basis und Oberkante laufen zu einem gemeinsa-

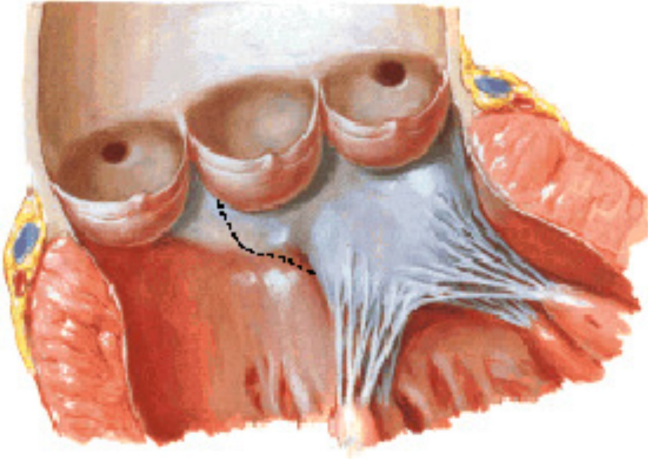


Abbildung 2.4: Aufsicht auf die Segel der Aortenklappe [65]

men Ansatzpunkt an der Gefäßwand (Kommissur) zusammen, an der sie mit Basis und Oberkante des nächsten Segels in Verbindung stehen. Im Bereich der Klappensegel weist die Gefäßwand Ausbuchtungen (die sogenannten *Sinus Valsalvae*) auf, die an der Klappenbasis beginnen und die Klappenoberkante etwas überragen. Die Klappensegel selbst legen sich bei Klappenschluss nicht in einer Linie, sondern im Bereich einer Fläche (Koaptation) aneinander, wobei sie dort, wo alle drei Segel aneinanderstoßen, eine knotige Verdickung aufweisen, die an der Pulmonalklappe nur schwach als *Noduli Morgagni* ausgeprägt sind, an der Aortenklappe jedoch deutlich als *Noduli Arantii* [27] ins Auge fallen und den kompletten Schluss der Klappe sicherstellen [24] (vgl. Abbildung 2.5). Das Segel ist von trabekulären Gewebszügen durchzogen (vgl. Abbildung 2.6), die entlang der Linien der höchsten mechanischen Belastung verlaufen und durch das Zusammenspiel zwi-

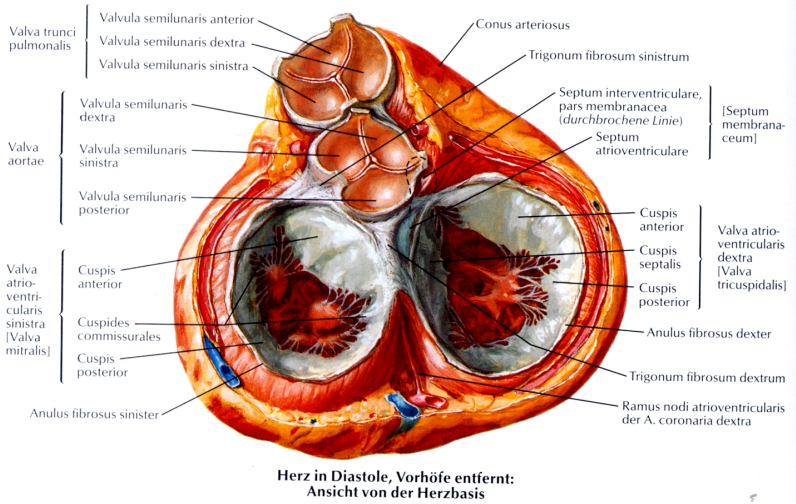


Abbildung 2.5: Aufsicht auf das Herzskelett in der Diastole [65]

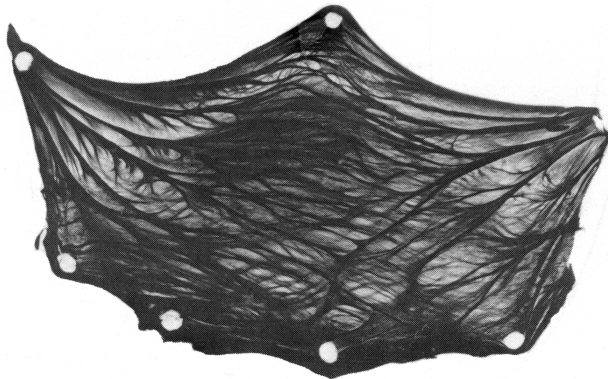


Abbildung 2.6: Makroskopisches Präparat eines Aortenklappensegels [77]

2 Anatomie und Physiologie der Herzklappen

schen elastischen und kollagenen Fasersystemen bedingt werden (siehe Kapitel 2.2.2).

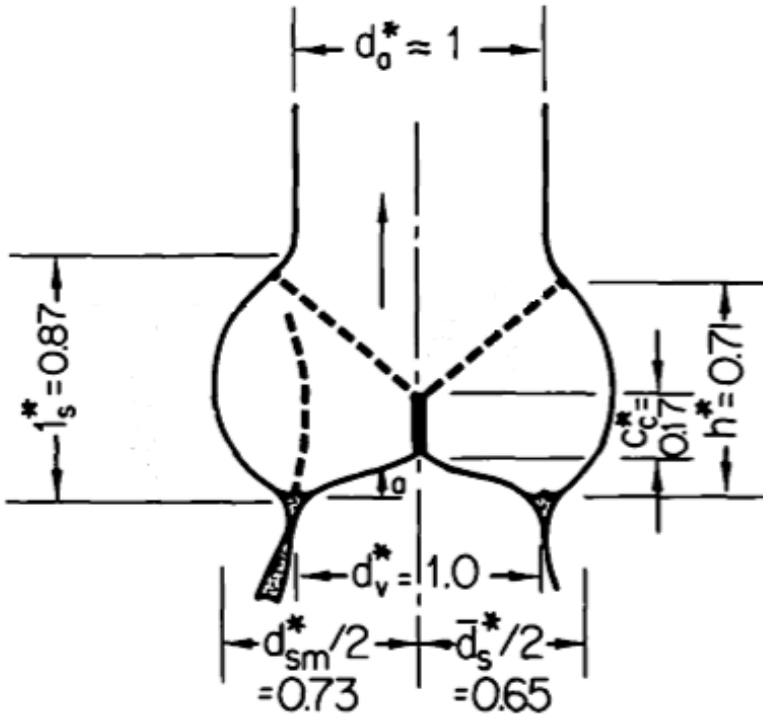


Abbildung 2.7: Dimensionen der Aortenklappe (Durchmesser des ventrikulären Ausflusstraktes $d=1$ gesetzt) [93]

Die Dimensionen der beschriebenen Strukturen haben Swanson und Clark [93] umfassend beschrieben, indem sie für eine Aortenklappe gemittelte Standardwerte angeben (vgl. Abbildung 2.7). Der Durchmesser des ventrikulären Ausflusstraktes an der Basis der Klappe (d_v) wird als Standardmaß der Größe 1,0 definiert, und alle anderen Dimensionen werden auf dieses normiert. Demnach beträgt der Durchmesser der Aorta beziehungsweise der Pulmonalarterie (d_a) ebenfalls 1, dazwischen vergrößert er sich durch die Sinus Valsalvae, deren Hö-

he (h) mit 0,71 angegeben wird, auf durchschnittlich (d_s) 1,3 und an ihrer maximalen (d_{sm}) Ausbuchtung auf 1,46. Die maximale Segellänge (l_c) ist mit 0,70 knapp kürzer als die Höhe der Sinus, wobei bei Klappenschluss die Segel über eine Höhe von 0,17 als Koaptation (C_c) aneinanderliegen.

Aufgrund großer Variation in der Dicke der Segel kann diese nicht als normierter Standardwert angegeben werden. Sie schwankt zwischen 0.32 und 0.48 mm, wobei diese Unterschiede auch bei den Segeln ein und derselben Person festgestellt werden können.

2.2.2 Mikroskopische Anatomie

Der topographische Aufbau eines Semilunarklappensegels folgt einer Grundstruktur, die sich am besten anhand der Schemazeichnung (vgl. Abbildung 2.8) nachvollziehen läßt. Vom arteriellen Schenkel her gesehen dünnt sich die *Lamina media* der Pulmonalarterie beziehungsweise der Aorta immer mehr aus (D) und geht in eine kollagenfaserhaltige Struktur, den *Annulus fibrosus* (E), über. Dieser *Annulus* schwingt sich in einer U-förmigen Kurve als *Lamina fibrosa* (A) in das Klappensegel hinein, setzt sich zum geringen Teil aber auch in den ventrikulären Ausflußtrakt fort, um sich dort zu verlieren (H).

Die Kollagenbündel der *Lamina fibrosa* führen auf der arteriellen Seite des Segels zu einer „Berg und Tal“-Struktur der Oberfläche, die auch makroskopisch in Form von Trabekeln, die entlang der Klappe laufen, sichtbar ist. Bei Klappenschluss glättet sich die Oberfläche, da der Klappenschluss mit einer Verlängerung des Segels einhergeht [27].

Vom ventrikulären Ausflußtrakt her setzt sich nur das Endokard auf das Segel fort, unter dem sich aber innerhalb des Segels elastische Fasern als *Ventricularis elastica* sammeln. Zwischen *Ventricularis* und *Fibrosa* liegt die stark proteoglycanhaltige [63] *Spongiosa* (B), die sich in

2 Anatomie und Physiologie der Herzklappen

den ventrikulären Ausflußtrakt hinein fortsetzt (C). Für die Verankerung der Klappe auf dem Herzen sorgt zusätzlich eine Verschränkung von Ausläufern des Myokards und des *Annulus fibrosus*.

In der Region unterhalb der Kommissuren findet sich gegenüber der Struktur der *Sinus Valsalvae*, deren Wand nur vom *Annulus* gebildet wird, eine Besonderheit: auf den kollagenhaltigen *Annulus* aufgelagert findet sich eine Anhäufung elastischer Fasern [37], nur schwach ausgeprägt auf pulmonaler Seite, jedoch prominent auf der aortalen. Weitere Differenzen zwischen Pulmonal- und Aortenklappe betreffen ebenfalls die Ausprägung der einzelnen Strukturen. Insgesamt imponieren alle geschilderten Schichten in der Pulmonalklappenregion sehr zart, wobei die *Spongiosa* und der subvalvuläre Teil des *Annulus Fibrosus* zum Teil kaum abgrenzbar sind [27].

Innerhalb der Klappen finden sich langgezogene, miteinander in Verbindung stehende Zellen, die sowohl Anzeichen synthetischer als auch kontraktiler Aktivität aufweisen können [23], also zum einen Fibroblasten, zum anderen glatten Muskelzellen ähnlich sind. Diese Beobachtung, die auch an Zellen aus Gefäßwänden gemacht wurde, hat unter der Annahme, dass diese Phänotypen unterschiedliche Differenzierungszustände ein- und derselben Zellart sind, zu der Bezeichnung Myofibroblast geführt: Fibroblasten reagieren auf mechanischen Streß mit der Bildung glattmuskulärer Proteine [70], können sich also zu Zellen kontraktiler Art differenzieren. Ob glatte Muskelzellen selber, die auch zu den interstitiellen Zellen der Herzklappen gehören [95], auch zu Myofibroblasten differenzieren können, ist noch unklar [96].

Innerhalb der Klappe ist die Verteilung der Phänotypen klar gegliedert: in der *Ventricularis* finden sich vor allem Zellen, die Fibroblasten ähnlich sind, wogegen die Zellen in der *Fibrosa* eher glatten Muskelzellen ähneln [27]. Ein ähnliches Verteilungsmuster ergibt sich in Gefäßwänden: Im Bereich der *Media* sind glatte Muskelzellen zu finden und im

10

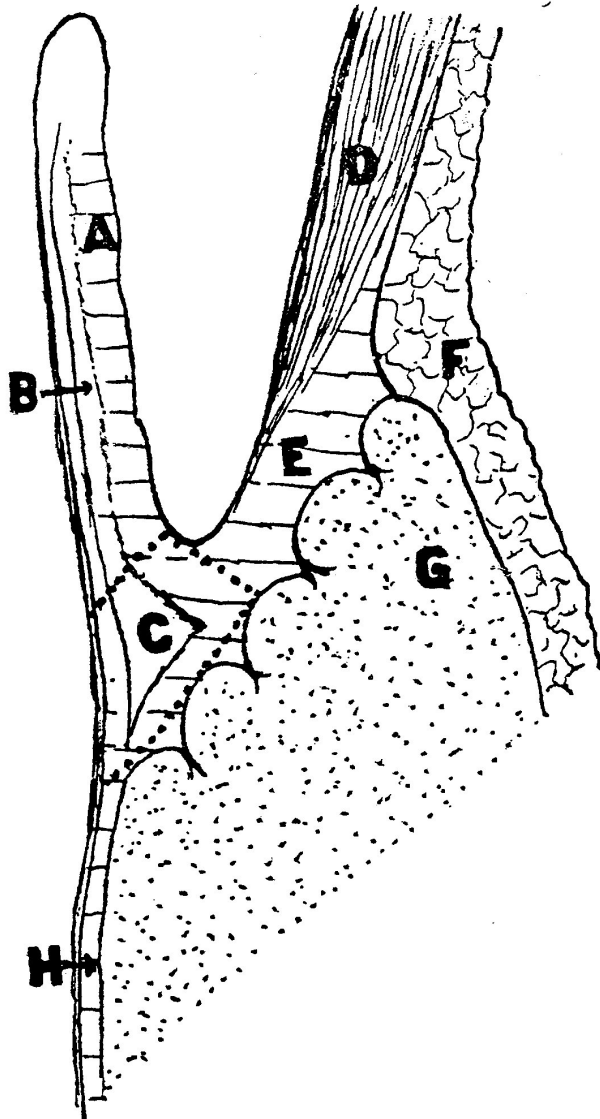


Abbildung 2.8: Mikroskopischer Aufbau der Semilunarklappen

A – Lamina fibrosa, B – Lamina spongiosa,

C – Annuläre Spongiosa, D – Pulmonalarterie,

E – Annulus fibrosus, F – Pericard, G – Myocard [27]

Bereich der *Adventitia* vorwiegend Fibroblasten [63].

Die Klappensegel sind auf ihrer Oberfläche von Endokardzellen bedeckt. Obwohl die genaue Rolle des Endokards im Vergleich zum Endothel von Gefäßen nicht klar ist, sind die Gemeinsamkeiten so groß, dass es möglich erscheint, eine tissue-engineerte Klappe anstatt mit Endokard mit Endothel auszukleiden [23], da es sich wahrscheinlich nicht um unterschiedliche Zellreihen, sondern verschiedene Differenzierungszustände einer Zellart handelt, die leicht ineinander übergehen [9].

2.3 Physiologie

In der Pulmonalarterie herrschen, ähnlich der Aorta, pulsatile Druckverhältnisse [31]: Bei Erwachsenen beträgt der maximale Druck in der Systole 25 mmHg, um während der Diastole auf etwa 8 mmHg abzufallen (vgl. Abbildung 2.9). Entsprechend beträgt der maximale Druck

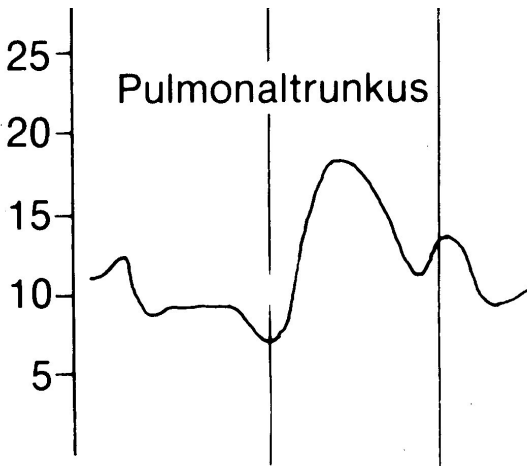


Abbildung 2.9: Druck im Pulmonaltrunkus während eines Herzschlages [81]

im rechten Ventrikel ebenfalls 25 mmHg, der allerdings kurz nach Ende der Systole auf fast 0 mmHg abfällt (vgl. Abbildung 2.10). Damit tritt am Beginn der Diastole eine maximale Druckdifferenz über die Klappe von fast 25 mmHg auf.

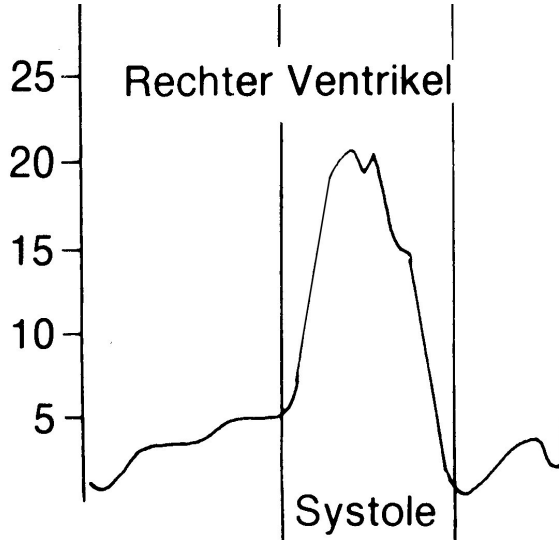


Abbildung 2.10: Druck im rechten Ventrikel während eines Herzschlages [81]

Die pulmonalen Druckverhältnisse bei Kindern im Alter von 10 Jahren weichen nur wenig von den oben angegebenen ab: lediglich der systolische Druck weicht mit 20 mmHg von den Daten des Erwachsenenalters ab. Entsprechend ergibt sich eine Druckdifferenz von 20 mmHg über die Klappe.

Dagegen zeigen Herzfrequenz und der systemische Blutdruck eine wesentlich stärkere Altersabhängigkeit (vgl. Abbildung 2.11): Der Puls eines Neugeborenen liegt bei etwa 140 Schlägen pro Minute, um bis zum Alter von fünf Jahren auf 100 Schläge pro Minute abzufallen. Ein junger Erwachsener hat mit 70 Schlägen pro Minute eine noch wesentlich

2 Anatomie und Physiologie der Herzklappen

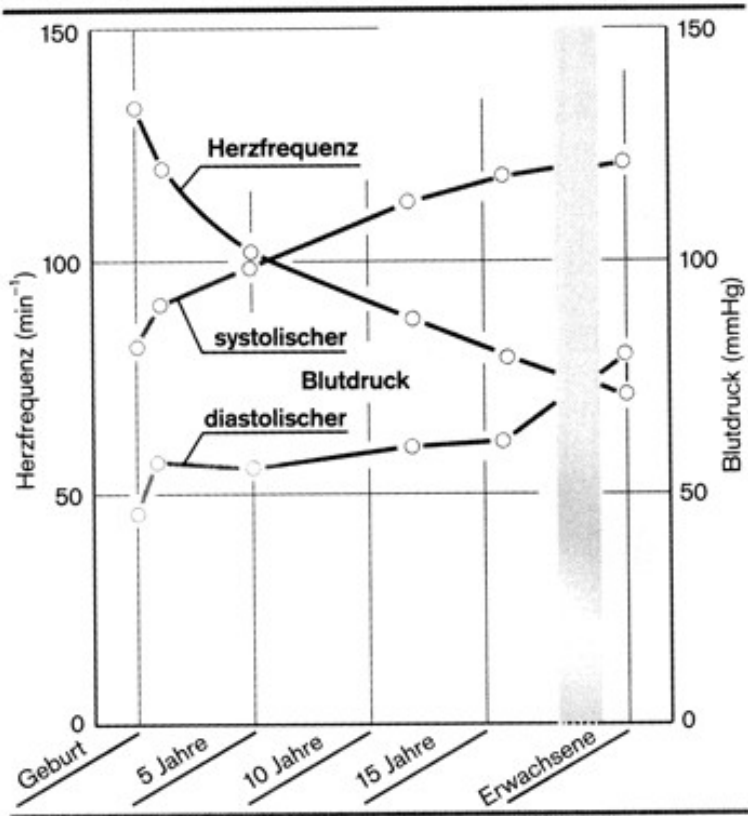


Abbildung 2.11: Herzfrequenz und Blutdruck in Abhängigkeit vom Alter [50]

geringere Herzfrequenz. Der systemische Blutdruck steigt mit zunehmenden Lebensalter von etwa 80 / 40 mmHg bei Geburt auf etwa 120 / 80 mmHg bei jungen Erwachsenen an und nimmt in fortgeschrittenem Alter weiter zu.

Dabei beträgt das Herzminutenvolumen bei Erwachsenen in Ruhe ungefähr 5 Liter pro Minute. Diese Flußrate verteilt sich allerdings nicht gleichmäßig über eine Herzaktion (vgl. Abbildung 2.12), sondern während der Systole kommt es je nach Belastungszustand zu Flußraten von 30 Litern pro Minute und mehr [32].



Abbildung 2.12: Stromstärke in der Aortenwurzel während eines Herzschlages [51]

Diesen besonderen Belastungen der Semilunarklappe – auf der einen Seite einem statischen Druckgradienten standhalten und auf der anderen den verformenden Beanspruchungen durch den Fluß in der Systole ausweichen zu müssen – ist ihre Morphologie angepaßt [63]. Als Hauptlastenträger für statische Kräfte ist die *Fibrosa* mit Kollagenfasern ausgestattet, während die elastinreiche *Ventricularis* dem Blutfluß zugewandt ist. Die Kollagenfasern der *Fibrosa* sind dabei hauptsächlich in Umfangsrichtung angeordnet, während die Faserrichtung in der *Ventricularis* keine Vorzugsrichtung zeigt. Durch diese Ausrichtung der Faserstruktur zeigen die Segel der Semilunarklappen sogenannte anisotrope mechanische Eigenschaften. Dies bedeutet, dass die Elastizität in radialer und circumferenter Richtung unterschiedlich ist (vgl. Abbildung 2.13).

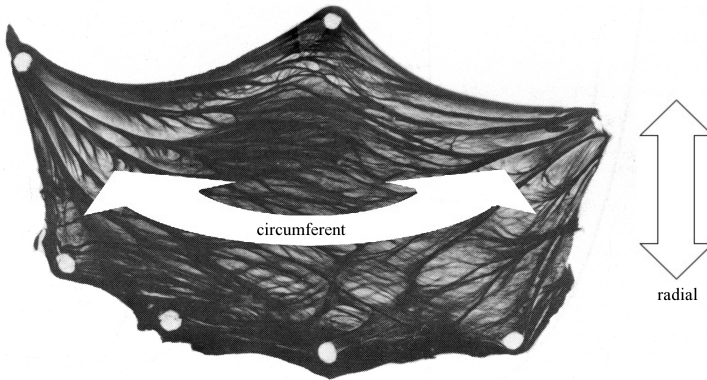


Abbildung 2.13: Definition radial – circumferent [77]

Radial sind sie mit einer Dehnung (Strain) von 45% bei einer Belastung (Stress) von 200 kN/m^2 elastischer als in Umfangsrichtung, in der bei gleicher Belastung eine Dehnung von nur 12% beschrieben wird [53]. Werden die Segel bis zum Zerreißen gedehnt, so ergibt sich in radialer Richtung eine Dehnung von 62.0% gegenüber einer Dehnung von 30.8% in Umfangsrichtung (vgl. Abbildung 2.14). Durch diese Anisotropie können sich die Klappensegel in der Systole dem radialen Blutstrom flexibel anlegen, um dennoch die während der Diastole auftretenden Belastungen in Umfangsrichtung aufnehmen und die für den Klappenschluss nötige Länge erreichen zu können.

Dabei sind die Klappensegel nie völlig entspannt; durch die gegenläufigen Kräfte von *Fibrosa* und *Ventricularis* entsteht immer eine innere Spannung im Segel, die während der Systole für einen Faltenwurf der *Fibrosa* sorgt, die sich während der Diastole unter Druck wieder streckt. So können die verschiedenen Schichten der Segel die auftre-

16

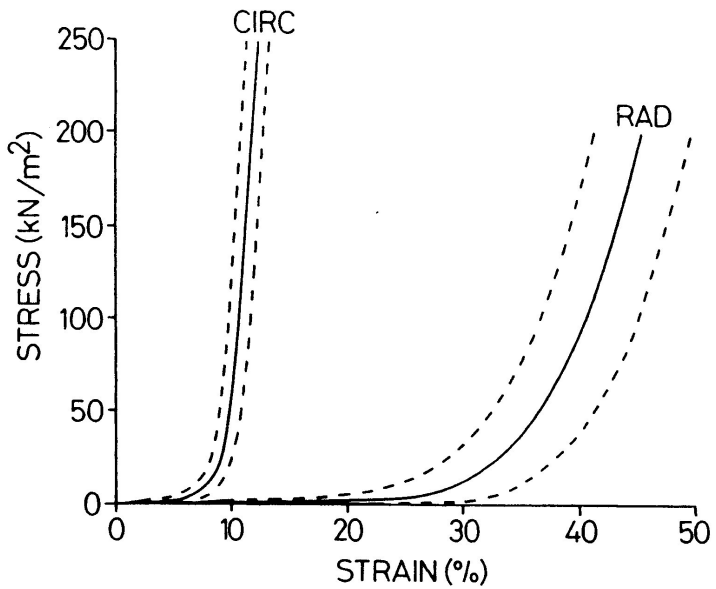


Abbildung 2.14: Stress-Strain-Kurven der Aortenklappe
CIRC – circumferent, RAD – radial [53]

tenden Kräfte gemeinsam perfekt auffangen.

Die *Sinus Valsalvae* erleichtern während der Systole durch die dort auftretenden Verwirbelungen das Öffnen der Klappe. Während der Diastole fließt das Blut auf aortaler Seite über die Sinus in die Koronararterien, die hinter den Klappensegeln in den *Sinus Valsalvae* der Aorta abgehen.

2.4 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der Herzklappe lässt sich in angeborene und erworbene Klappenvitien unterteilen. Dabei führen Klappenveränderungen auf zwei Wegen zu symptomatischen Erkrankungen [10]: Zum einen kann die Stenose oder die Insuffizienz einer Herzklappe oder deren Kombination zu einer hämodynamischen Belastung der Herzkammern und durch diese möglicherweise zu einer Herzinsuffizienz führen.

Der zweite Weg zu einer symptomatischen Erkrankung beruht auf der höheren Infektionsanfälligkeit einer strukturell veränderten Herzklappe, die eine Prädisposition für eine infektiöse Endokarditis darstellt.

Bei der Stenose einer Herzklappe kommt es durch den erhöhten Widerstand, gegen den das Herz arbeitet, zu einer Druckbelastung des entsprechenden Ventrikels. Das Myokard reagiert auf diese Belastung mit konzentrischer Hypertrophie. Der hypertrophierte Muskel benötigt zu seiner Versorgung einen höheren Blutfluß, der ab einer kritischen Wandstärke von 2 cm unter Belastung nicht immer aufrechterhalten werden kann. Dadurch kommt es zu myokardialen Ischämien, die in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz münden können.

Bei der Insuffizienz einer Herzklappe führt das in der Diastole zurückströmende Blut zu einer Volumenbelastung und Dilatation des Ventrikels. Dadurch kommt es zunächst über den sogenannten *Frank-Starling-Mechanismus* zu einer Verbesserung der Auswurfleistung. Dabei ent-

steht durch die Vordehnung der Muskelfasern eine effektivere Überlappung der kontraktilen Elemente, und diese werden für Calcium sensibilisiert. Bei zu starker Dehnung jedoch erschöpft sich dieser Mechanismus, und die Kontraktion wird weniger kräftig. Außerdem führt die durch die erhöhte Füllung verstärkte Wandspannung zu einer verminderten Durchblutung des Myokards.

Durch diese schädigenden Mechanismen können Stenose und Insuffizienz einer Herzklappe zur akuten cardialen Dekompensation bis hin zur terminalen Herzinsuffizienz führen.

2.4.1 Erworbene Klappenfehler

Erworbene Herzklappenfehler sind zumeist degenerativer oder infektiöser Natur, wobei die Inzidenz der erregerbedingten Klappenerkrankungen im Vergleich zu degenerativen Erkrankungen abnimmt [26].

2.4.1.1 Degenerative, calcifizierende Aortenstenose

Die degenerative, calcifizierende Aortenklappenstenose ist der häufigste erworbene Herzfehler. Durch Alterungsprozesse kommt es zur Sklerose der Klappensegel, die hierdurch versteifen und durch bizarr geformte Calciumablagerungen deformiert werden (vgl. Abbildung 2.15). Die Calcifikation schreitet vom Annulus über die Klappenbasis bis zu den freien Rändern der Klappe fort [10]. Die degenerative Aortenklappenstenose ist normalerweise eine Erkrankung des höheren Lebensalters mit einem Häufigkeitsgipfel um das 60. Lebensjahr. Jedoch haben Menschen mit einer angeborenen bicuspiden Aortenklappe (etwa 2% der Bevölkerung) ein deutlich erhöhtes Risiko, bereits um das 40. Lebensjahr symptomatische degenerative Veränderungen der Aortenklappe zu erwerben, was im wesentlichen auf die höhere mechanische Beanspruchung einer solchen bicuspiden Klappe zurückgeführt wird [26].

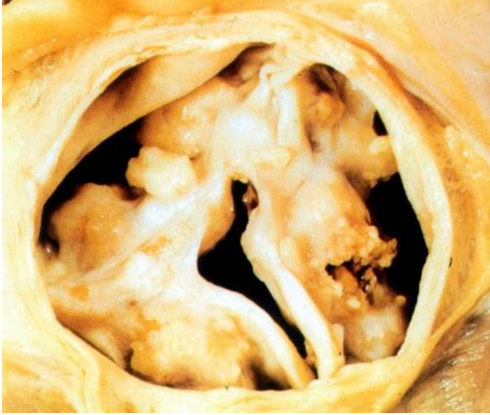


Abbildung 2.15: Verkalkte Aortenklappe [49]

2.4.1.2 Infektiöse Endokarditis

Eine Infektion des Endokards durch Bakterien oder Pilze manifestiert sich zumeist an den Herzklappen. Auf einer auch nur leicht vorgeschädigten Klappe können sich Keime aus dem Blutstrom absiedeln, die dort aufgrund der geringen Anzahl der Blutgefäße auf eine verminderte Abwehrreaktion stoßen [10]. Herzklappen befinden sich zwar im Blutstrom und sind dort von Abwehrzellen umgeben. Doch ist erstens die Austauschfläche zum Blut wesentlich geringer als bei kapillarisierten Organen, und zweitens können Abwehrzellen das Kapillarendothel wesentlich leichter überwinden und in das Gewebe migrieren, als dies bei cardialem Endothel möglich ist [61]. Eingedrungene Keime wachsen auf Herzklappen in Form sogenannter Vegetationen und können sowohl Klappeninsuffizienzen als auch Stenosen verursachen und als septischer Streuherd in Erscheinung treten [26].

Die infektiöse Endokarditis tritt mit einer Inzidenz von etwa 5 Fällen auf 100.000 Einwohnern pro Jahr auf [26]. Sie kann in ihrer fulminanten Form innerhalb von wenigen Tagen zur Destruktion der Klappe und somit zur Herzinsuffizienz führen, aber auch einen chronischen Verlauf

20

über Wochen bis Monate nehmen. Die Prognose ist auch bei optimaler Behandlung mit einer Mortalität von 25% schlecht [26].

Für die infektiöse Endokarditis lassen sich drei Gruppen von Risikofaktoren definieren [10]:

1. **Veränderte Klappen:** Durch eine bereits vorgeschädigte oder bicuspidale Klappe kommt es leichter zu Endokardläsionen, welche wiederum die Absiedlung von Keimen begünstigen.
2. **Herzklappenprothesen:** Der Ersatz einer Herzklappe durch eine mechanische oder biologische Prothese ist mit einem erhöhten Risiko einer Endokarditis verknüpft. Auf der Fremdoberfläche entwickelt sich ein bakterieller „Biofilm“, innerhalb dessen die Bakterien vor dem Immunsystem geschützt sind. Deshalb sind solche Endokarditiden sehr schwer therapierbar.
3. **Längerandauernde Keimbelastung des Blutes:** Durch liegende Katheter oder intravenösen Drogenabusus sind die Herzklappen einer ständigen Bakteriämie ausgesetzt; auf diese Weise entstehen Endokarditiden insbesondere im Bereich des rechten Herzens.

2.4.2 Angeborene Klappenfehler

Angeborene Herzfehler sind mit 8 auf 1.000 Lebendgeburten eine der häufigsten angeborenen Malformationen [10]. Diese betreffen oft Herzklappen oder sind mit pathologischen Veränderungen dieser assoziiert. Es handelt sich meist um Stenosen, die bisweilen mit einer Insuffizienz kombiniert sind. Der Stenosegrad kann bis zu einem völligen Fehlen jeglicher Öffnung, (Atresie) reichen.

2.4.2.1 Valvuläre Obstruktionen im Bereich des rechten Herzens

Obstruktionen des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (mit der valvulären Pulmonalstenose als häufigster) bestehen isoliert oder in Kombination mit anderen Malformationen bei 30% aller angeborenen Herzfehler [20]. Meist finden sich Verwachsungen oder Verklebungen der Kommissuren, die zu unbedeutenden Stenosen aber auch bis hin zur fast verschlossenen Klappe in Form der „Knopflochstenose“, die nur noch einen minimalen Restfluß erlaubt, führen können [83]. Eine valvuläre Pulmonalstenose kann auch durch dysplastische, myxomatös aufgequollene Klappensegel verursacht werden, deren Gewebelumina die Stenose verursachen.

Als Folge der Stenose kommt es zu einer konzentrischen Hypertrophie des rechten Ventrikels insbesondere im Bereich des rechtsventrikulären Ausflusstraktes, wodurch es während der Systole zusätzlich zu einer muskulären Einengung kommen kann. Hinter der veränderten Klappe kommt es durch turbulenten Blutfluß zu einer Dilatation des Pulmonalishauptstammes, insbesondere bei leichtem bis mäßigem Stenosegrad [83]. Die durchschnittliche Lebenserwartung von Patienten mit Pulmonalstenose beträgt bei natürlichem Verlauf 21 Jahre, wobei die schädigende Belastung des rechtsventrikulären Myokards als Ursache anzusehen ist [10].

Ein fast kompletter Verschluss der Pulmonalklappe durch die oben erwähnte Knopflochstenose oder eine Pulmonalatresie führen bei intaktem Ventrikelseptum zu einer starken Hypertrophie des rechten Ventrikels und insbesondere bei einer Atresie zu einem stark verminderten Lumen. Das venöse Blut aus dem Körperkreislauf wird hier durch ein obligatorisch vorhandenes persistierendes *Foramen ovale* vom rechten in den linken Vorhof gepumpt. Die Lungendurchblutung erfolgt in nahezu allen Fällen über einen persistierenden *Ductus arteriosus Botalli*

li. Die Größe und Persistenz dieser beiden Shuntverbindungen ist zunächst für das postnatale Überleben dieser Kinder entscheidend. Nur wenige Patienten mit einer solchen Fehlbildung erleben ohne Therapie den 3. Lebensmonat [83]. Tritt eine Pulmonalatresie in Kombination mit einem Ventrikelseptumdefekt auf, so erfolgt die Lungenperfusion zum Teil nicht über den Ductus arteriosus, sondern über andere, in der Embryonalphase angelegte systemicopulmonale Kollateralen. Diese ermöglichen auch ohne Therapie ein längeres Überleben bis ins 20. Lebensjahr [62].

Die Kombination aus Pulmonalstenose, daraus folgender rechtsventrikulärer Hypertrophie, einem Ventrikelseptumdefekt und einer über diesem Ventrikelseptumdefekt abgehenden, „reitenden“ Aorta wird als *Fal-lot'sche Tetralogie* bezeichnet. Je nach Schweregrad der Stenose des rechtsventrikulären Ausflusstraktes erfolgt die Lungendurchblutung durch den *Ductus arteriosus Botalli*. In diesen Fällen führt die *Fal-lot'sche Tetralogie* kurz nach Geburt beim Verschluss des *Ductus arteriosus* zu einer hochgradigen und lebensbedrohlichen Zyanose. Bei geringerer Stenose kommt es typischerweise bei Belastung zu hypoxämischen Anfällen mit Bewusstseinsverlust durch eine kritische Zunahme der infundibulären Stenose [83]. Bei natürlichem Verlauf beträgt die mittlere Lebenserwartung 12 Jahre [1].

Angeborene Veränderungen der Trikuspidalklappe sind außerordentlich seltene Erkrankungen. Bei der *Ebstein-Anomalie* sind das posteriore und septale Segel der Klappe mit dem Endokard des rechten Ventrikels verwachsen [82]. Dadurch kommt es zur Teilung des rechten Ventrikels in einen unterentwickelten, proximalen Teil und einen distalen, normal entwickelten Teil. Somit ist die Lungendurchblutung vermindert. Veränderungen der Trikuspidalklappe können bis hin zur kompletten Atresie reichen, bei der das Blut aus dem venösen System über ein obligat persistierendes *Foramen ovale* vom rechten in den linken Vor-

2 Anatomie und Physiologie der Herzklappen

hof gelangt. Die Lungendurchblutung erfolgt, wie oben beschrieben, entweder über einen persistierenden *Ductus arteriosus Botalli* oder die systemicopulmonalen Kollateralen [84].

2.4.2.2 Valvuläre Obstruktionen im Bereich des linken Herzens

Im Bereich des linken Herzens ist die bicuspide Aortenklappe die häufigste valvuläre Veränderung (vgl. Kapitel 2.4.1.1). Diese geht nur selten mit einer Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes einher, kann sich aber im Laufe der Zeit zu einer erworbenen Aortenklappenstenose entwickeln. Bei stärkerer „kritischer“ Obstruktion kann es bereits im Neugeborenenalter zur Dekompensation des linken Ventrikels kommen, die ohne Therapie rasch zum Tode führen kann [34].

Eine solche „kritische“ Obstruktion kann auch ohne bicuspide Aortenklappe als hochgradige Aortenstenose vorliegen. Patienten mit einer solchen Obstruktion können nur dank einer Kommissurotomie in den ersten Lebenstagen die Neugeborenenperiode überleben.

Das Fehlen der Aortenklappenanlage beziehungsweise deren kompletter Verschluss führt zum *Hypoplastischen Linksherzsyndrom*. Dabei fließt das Blut aus dem linken Vorhof entweder über einen Vorhofseptumdefekt in den rechten Vorhof oder bei offener Mitralklappe über einen Ventrikelseptumdefekt vom linken in den rechten Ventrikel. Der Körperkreislauf wird über einen offenen *Ductus Arteriosus Botalli* perfundiert. Dadurch kommt es zur Druck- und Volumenbelastung des rechten Vorhofes und des rechten Ventrikels, die entsprechend eine Hypertrophie und eine Dilatation aufweisen. Ohne Therapie sterben 80% der Kinder mit *Hypoplastischem Linksherzsyndrom* innerhalb der ersten Lebenswoche[83].

Eine Stenose der Mitralklappe ist ein seltenes angeborenes Vitium, wel-

ches zumeist mit anderen Herzfehlern, darunter am häufigsten dem Ventrikelseptumdefekt, einhergeht. Durch den erhöhten Druck im linken Vorhof kommt es zum Lungenödem und zur Rechtsherzinsuffizienz [26]. Die mittlere Lebenserwartung bei kongenitaler valvulärer Mitralsenose liegt ohne Therapie bei 3 Jahren [78].

2 Anatomie und Physiologie der Herzklappen

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

3.1 Prinzipien des Tissue Engineerings

Tissue Engineering kombiniert die Methoden der Ingenieurwissenschaften und der medizinisch-biologischen Wissenschaften, um biologische Ersatzstoffe zu entwickeln, die Gewebefunktionen wiederherstellen, aufrechterhalten oder verbessern [87]. Drei grundsätzliche Strategien werden hierfür herangezogen [52] :

1. Isolierte Zellen oder Zellersatzstoffe
2. Substanzen, die die Gewebsentwicklung beeinflussen
3. Zellen, die sich in oder auf Matrices befinden.

Das valvuläre Tissue Engineering dient dazu, eine Herzklappe zu einem definierten Zeitpunkt komplett zu ersetzen, um dadurch ihre Funktion wiederherzustellen. Um diesen Anspruch zu erfüllen, ist die Implantation einer besiedelten Matrix in Form einer Semilunarklappe ein gangbarer Weg. Diese Strategie (vgl. Abbildung 3.1) beruht im einzelnen darauf, patiententeigene Zellen durch eine Biopsie zu gewinnen, diese *in vitro* zu vermehren und dann eine dreidimensionale Leitstruktur, den Scaffold, mit den gewonnenen Zellen zu besiedeln. Auf diese Weise kann ein neues Gewebe, ein Neotissue, geschaffen werden, welches

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

entweder direkt nach Zellbesiedlung oder nach weiterer Kultur als Ersatz für die erkrankte Herzklappe implantiert werden kann.

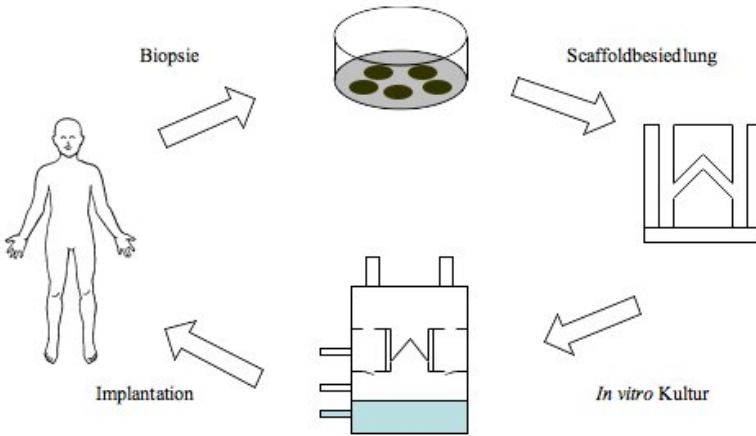


Abbildung 3.1: Prinzip des valvulären Tissue Engineerings

3.2 Klinischer Hintergrund des valvulären Tissue Engineerings

Die heutige Therapie von Herzklappenfehlern ist bei fehlender Rekonstruktionsmöglichkeit – sowohl im Erwachsenen- als auch im Kindesalter – der Ersatz durch eine mechanische Klappenprothese, eine Klappe tierischen Ursprungs (Xenograft) oder ein menschliches Transplantat (Homograft)[100]. Diese Möglichkeiten des Klappenersatzes sollen im folgenden miteinander verglichen werden.

3.2.1 Mechanische Klappenprothesen

Die mechanische Klappenprothese weist eine sehr hohe Stabilität auf, die auf der Qualität der verwendeten Materialien beruht. Bis auf wenige Ausnahmen halten sie der mechanischen Belastung in aortaler Position lebenslang stand [14].

Die Eigenschaften dieser Materialien bedingen jedoch auch die Nachteile der mechanischen Klappenprothesen. Als Oberflächen ohne Endothelwandung und durch die verursachten Veränderungen des Blutflußprofils bergen sie ein erhöhtes Risiko der Thrombenbildung und nachfolgender Embolisierung. Dem muss durch lebenslange Antikoagulation entgegengewirkt werden, wodurch wiederum das Risiko bedrohlicher Blutungen steigt [11]. Entsprechend bietet der Einsatz von mechanischen Prothesen bei Populationen mit erhöhtem Blutungsrisiko (zum Beispiel Kindern und Frauen mit Kinderwunsch) Schwierigkeiten. Außerdem sind mechanische Klappenprothesen als Fremdoberflächen anfälliger für eine bakterielle Besiedlung mit zum Beispiel dem Risiko einer daraus entstehenden Endokarditis. Heutzutage machen klappenersatzassoziierte Erkrankungen 10% bis 20% aller infektiösen Endokarditiden aus [10].

3.2.2 Xenografts

Glutaraldehydfixierte Xenografts werden meist aus Schweineklappen oder Rinderpericard hergestellt. Der Fixationsprozeß tötet dabei die zellulären Bestandteile der tierischen Klappe vollständig ab und schafft Quervernetzungen der Bindegewebsstruktur. Hierdurch werden Abstoßungsreaktionen unterdrückt, und die Bindegewebsmatrix erhält eine bessere Haltbarkeit.

Wesentlicher Vorteil der Xenografts gegenüber mechanischen Klappenprothesen ist das deutlich geringere thrombembolische Risiko: oh-

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

ne Antikoagulation entspricht es etwa dem mechanischer Klappen bei ausreichender Gerinnungshemmung [100]. Dies wird zum einen durch physiologischere Eigenschaften der biologischen Prothesen im Bereich der Hämodynamik bedingt, zum anderen durch einen geringeren Einfluß der Oberfläche der tierischen Klappen auf das Gerinnungssystem.

Da zum Teil kalzifizierende Prozesse die Bindegewebsmatrix der Xenografts nach und nach zerstören, wird dieser Vorteil durch einen entscheidenden Nachteil erkaufte : Bioprothesen haben eine wesentlich ge-

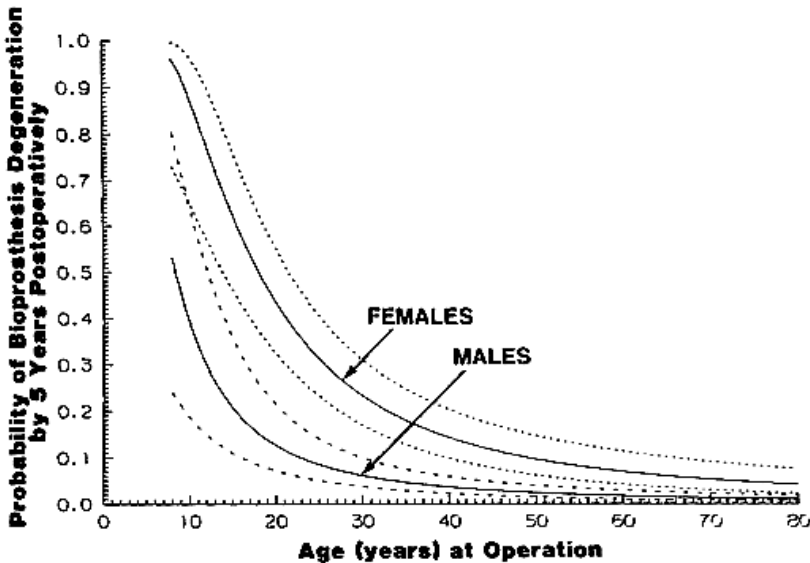


Abbildung 3.2: 5-Jahres-Versagenswahrscheinlichkeit von Bioprothesen in Abhängigkeit vom Alter der Patienten bei Operation (nach Blackstone et al.) [7]

ringere Haltbarkeit; innerhalb von 15 Jahren versagen bis zu 50% der eingesetzten Klappen und dies insbesondere bei Patienten, die jünger als 35 Jahre sind [39], [7]. Bei Kindern ist das Risiko des Versagens noch deutlich höher: Bei zehnjährigen Mädchen versagen Xenografts innerhalb von 5 Jahren zu fast 100 Prozent, bei Knaben der gleichen Al-

30

3.2 Klinischer Hintergrund des valvulären Tissue Engineerings

terststufe noch 50 Prozent der implantierten Prothesen (vgl. Abbildung 3.2). Dittrich et al. zeigten in ihrer Gegenüberstellung der Operationsfreiheit bei Xenografts und menschlichen Transplantaten bei Patienten, die jünger als 6 Jahre sind, ähnlich ernüchternde Ergebnisse für tierische Transplantate (vgl. Abbildung 3.3). In dieser Studie wurde die Interventionsfreiheit im Sinne von Katheterinterventionen untersucht: Bei Empfängern von Xenografts mussten über einen Zeitraum von 2 Jahren 60 Prozent der Patienten katheterinterventionell behandelt werden, während bei Empfängern menschlicher Transplantate sich keiner der Patienten einem solchen Eingriff unterziehen musste (vgl. Abbildung 3.4). Daneben sind Patienten mit Xenografts auch einem hohen Endokarditisrisiko ausgesetzt: es entspricht demjenigen mechanischer Klappen [10].

3.2.3 Homografts

Optimale Hämodynamik und beste Biokompatibilität und damit auch niedriges thrombembolisches Risiko bieten cryokonservierte menschliche Transplantate. Entsprechend werden sie gerne bei der Therapie von Kindern mit kongenitalen Herzfehlern eingesetzt [8]. Dennoch sind auch Homografts weit vom idealen Klappenersatz entfernt: sie bieten entsprechend ihrer Herkunft alle Komplikationen einer Organtransplantation. Abstoßungsreaktionen führen zu einer Haltbarkeit, die etwa auf dem Niveau von Xenografts liegt; die Verfügbarkeit ist begrenzt, und es besteht die Möglichkeit einer Infektionsübertragung [21]. Außerdem besitzen Homografts kein Wachstumspotential, was insbesondere bei Kindern von Nachteil ist, da dies Reoperationen unabhängig von der Haltbarkeit der Klappen erforderlich macht.

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

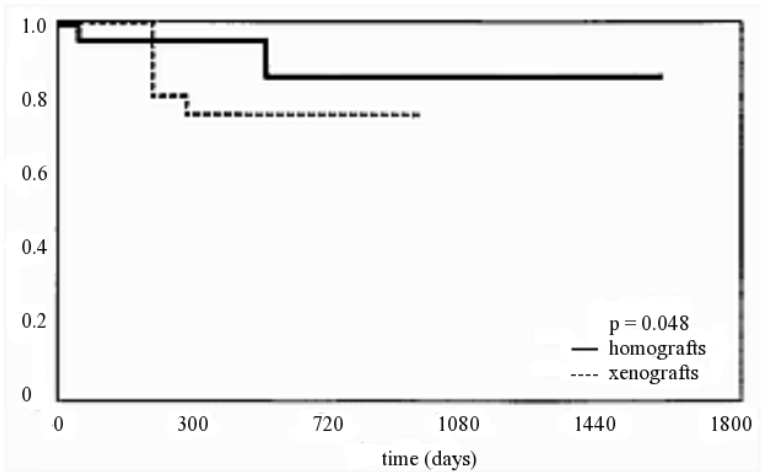


Abbildung 3.3: Vergleich der Operationsfreiheit zehnjähriger Kinder nach Klappenersatz durch Homografts und Xenografts (nach Dittrich et al.) [18]

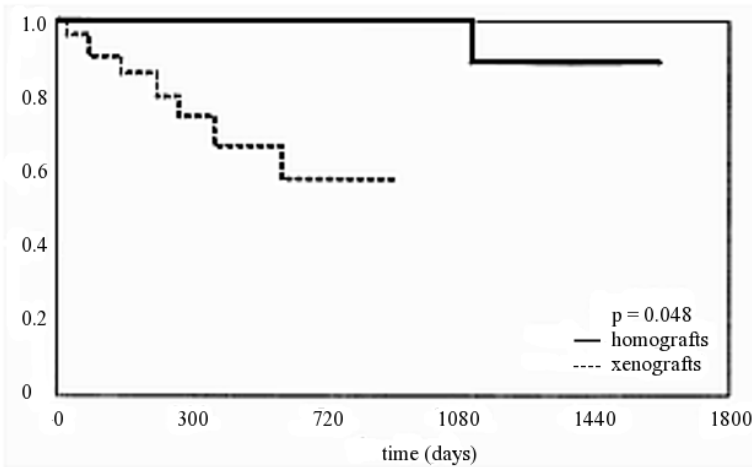


Abbildung 3.4: Vergleich der Interventionsfreiheit nach Klappenersatz durch Homografts und Xenografts bei sechsjährigen Kindern (nach Dittrich et al.) [18]

3.2.4 Definition des idealen Klappenersatzes

Insgesamt stellen die heute zur Verfügung stehenden Verfahren des prothetischen Klappenersatzes eine deutliche Verbesserung für Patienten mit Herzklappenfehlern dar. Sie sind aber weit entfernt von einer idealen Lösung. Diese ideale Lösung beschreiben Mayer et al. wie folgt [60]:

Ein idealer Klappenersatz müßte lange haltbar und frei von Thrombogenität sein; er müßte normale hämodynamische Verhältnisse herstellen und dürfte Blutbestandteile nicht schädigen. Außerdem muss seine Implantation chirurgisch möglich sein. Zusätzlich sollte er nicht infektionsanfällig sein und keine Immunogenität aufweisen. Für pädiatrische Patienten sollte ein Klappenersatz außerdem mitwachsend sein, um wiederholte Operationen zu vermeiden.

Da das Konzept des Tissue Engineerings die Entwicklung eines Gewebersatzes zum Ziel hat, der vom nativen Gewebe nicht zu unterscheiden ist, also exakt gleich aufgebaut ist und lebendes Gewebe darstellt, erscheint dies als ein Weg, die Einschränkungen der jetzigen Möglichkeiten des prothetischen Klappenersatzes zu überwinden. Insbesondere für die Therapie von kongenitalen Klappenfehlern sollten dadurch erhebliche Vorteile zu erzielen sein.

3.3 Historische Entwicklung des Tissue Engineerings

Die ersten Schritte in Richtung eines valvulären Tissue Engineerings wurden auf der Grundlage mechanischer Klappenprothesen unternommen. Unter der Vorstellung, die Verträglichkeit mit dem menschlichen Organismus durch ein funktionsfähiges Endothel verbessern zu können, beschichteten MacGregor et al. [58] die Oberflächen mechanischer

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

Klappenprothesen mit Endothelzellen. *In vitro* konnten Komponenten aus pyrolytischem Carbon, so die Klappensegel der verwendeten Prothesen, konfluent mit Endothelzellen besiedelt werden, wogegen eine Besiedlung metallener Komponenten nicht möglich war.

Bengtsson et al. [6] implantierten auf diese Weise beschichtete Klappen bei Schweinen in Pulmonalposition. Schon eine Stunde nach Implantation konnten auf den Segeloberflächen nur noch wenige Endothelzellen nachgewiesen werden. Eine Zellbeschichtung von Oberflächen aus Metall oder pyrolytischem Carbon scheint also nicht zu einer endothelzellbesiedelten Klappenprothese zu führen, die einer *in-vivo* Belastung an Pulmonalklappenposition standhält.

Fischlein et al. [22] unternahmen den Versuch, glutaraldehydfixierte Klappenprothesen mit Endothelzellen zu beschichten, der jedoch wie viele weitere Versuche auf der Grundlage glutaraldehydfixierter Xenografts von Schwierigkeiten begleitet war, eine konfluente Endothelzellschicht zu erzeugen und *in vitro* oder *in vivo* zu bewahren.

Gulbins et al. [29] stellten zwei wesentliche Gründe für diese Schwierigkeiten dar und zeigten Möglichkeiten auf, sie zu umgehen.

1. Glutaraldehyd ist cytotoxisch. Entsprechend führt das vorherige Waschen der Prothesen in Zellkulturmedium zu dichter Besiedlung.
2. Glutaraldehyd vernetzt die Bindegewebsmatrix der Klappe. Dies führt einerseits zu erhöhter mechanischer Stabilität, aber auch zu starker Hydrophilie der Bioprothese. Eine Vorbehandlung mit Citrat führt zur Bildung hydrophiler Gruppen am Bindegewebsgerüst und verbessert so die Besiedlung mit Endothelzellen.

Gulbins et al. konnten durch diese Vorbehandlung eine 65-prozentige Besiedlung der Klappenprothese erreichen. Eine konfluente Endothel-

3.3 Historische Entwicklung des Tissue Engineerings

zellbesiedlung konnte in dieser Versuchsreihe erst nach vorhergehender Beschichtung der Klappe mit Fibroblasten erreicht werden, denn obwohl Endothelzellen an vielen Oberflächen anhaften können, ist die Intensität der Adhäsion und die nachfolgende Stabilität Folge der Präsenz extrazellulärer Matrixproteine [29]. Eines der wichtigsten Anheftungsproteine für Endothelzellen ist das in der Basalmembran eines Gefäßes eingelagerte Kollagen IV. Dieses wird von den Endothelzellen in einem physiologischen Umfeld selber synthetisiert, auf unphysiologischen Oberflächen, zum Beispiel Polyurethan [28], stellen sie die Synthese dieses Proteins allerdings ein. Eine vorherige Beschichtung mit Fibroblasten, die leichter auf unphysiologischen Oberflächen anhaften und dort extrazelluläre Matrix synthetisieren, stellt den Endothelzellen ein physiologisches Milieu zur Verfügung und verbessert Anhaftung und Proteinsynthese wesentlich [29]. Dies erklärt die oben erwähnte Verbesserung der Endothelzellbeschichtung nach vorheriger Besiedlung des Gewebes mit Fibroblasten.

Aus diesen Überlegungen erscheint es sinnvoll, die Endothelzellen nicht an ein totes Gewebe anhaften zu lassen, sondern statt dessen erst eine vitale Stützstruktur zu erzeugen, die der Klappengrundstruktur entspricht, und erst dann eine Besiedlung mit Endothelzellen vorzunehmen.

Das Ziel des cardiovascularen Tissue Engineerings verschiebt sich damit von einer reinen Zellbeschichtung in Richtung auf die dreidimensionale Zellkultur zur Schaffung eines komplett neuen Gewebes. Um dieses Neotissue zu erzeugen, sind zwei Komponenten nötig: Zellen und Matrix [52]. Zellen in einfacher zweidimensionaler Gewebekultur können zwar Matrixproteine synthetisieren, jedoch ordnen sie sich nicht in Form einer Herzklappe an. Darum bedarf es einer formgebenden Struktur, eines Scaffolds, durch das die Gewebeentwicklung in einer im Raum gerichteten Form erfolgen kann.

3.4 Komponenten des Cardiovasculären Tissue Engineerings

3.4.1 Zelluläre Komponenten

Die optimale Zellquelle für Cardiovasculäres Tissue Engineering ist Gegenstand intensiver Diskussion.

Arterielle und venöse Biopsien werden ebenso als Material für die Zellgewinnung eingesetzt wie Knochenmark und Nabelschnurgefäße. Die Eignung einer Zellquelle für das Tissue Engineering wird durch den Nachweis von Markerproteinen geprüft: Wenn eine Zelle innerhalb eines tissue-engineerten Gewebes Zeichen eines Myofibroblasten aufweist, ist die Zellquelle grundsätzlich als Quelle für interstitielle Zellen geeignet. Hier werden Alpha-Smooth-Muscle-Actin (α -SMA), Desmin und Vimentin [45] benutzt. Genauso muss eine Endothelzellbesiedlung durch spezifische Zellmarker nachgewiesen werden. Das klassische Kennzeichen von Endothelzellen ist der in Weibel-Palade-Körperchen eingelagerte von-Willebrand-Faktor [89].

Im Tiermodell stellen arterielle Biopsien insbesondere der Carotiden die klassische Zellquelle für cardiovasculäres Tissue Engineering dar. Solange das cardiovasculäre Tissue Engineering keine klinische Anwendung findet, ist dies ein gangbarer Weg, doch bei Patienten ist dieses Vorgehen sicher nicht möglich. Eine Alternative sind venöse Biopsien. Hoerstrup, Zund, Sodian et al. konnten 2001 in einer Vergleichsstudie [80] keine Unterschiede in der Gewebeentwicklung und Zellmorphologie zwischen diesen beiden Zellquellen zeigen. Daher scheinen venöse Myofibroblasten eine geeignete Zellquelle für das cardiovasculäre Tissue Engineering zu sein.

Auf der Suche nach einer noch leichter zugänglichen Zellquelle verdient insbesondere das Knochenmark große Aufmerksamkeit, da es im

3.4 Komponenten des Cardiovasculären Tissue Engineerings

Vergleich zu venösen oder gar arteriellen Biopsien wesentlich leichter zugänglich ist. Stromazellen aus Knochenmark wurden von Kadner et al. 2002 durch Kultur auf einem bioabsorbierbaren Scaffold untersucht [46]. Auch hier zeigten sich nach statischer Kultur keine morphologischen Unterschiede zu Myofibroblasten und eine vergleichbare Gewebeentwicklung, so dass dieses Verfahren als eine wichtige Bereicherung auf der Suche nach leicht zu gewinnenden Zellen angesehen werden kann.

Für pädiatrische Patienten stellt die Nabelschnur eine wichtige Quelle für Zellen dar. So werden zum Beispiel für Stammzelltransplantationen bei Leukämien bereits erfolgreich Zellen aus Nabelschnurblut verwendet [68]. Bei Kindern, bei denen ein Klappenfehler bereits vor der Geburt bekannt ist, könnte durch die Nabelschnur als Zellquelle die Notwendigkeit einer Biopsie komplett umgangen werden. Kadner et al. haben auch diese Zellen in einer Vergleichsstudie im Hinblick auf Gewebeformation mit venösen Myofibroblasten verglichen [47]. Dabei wurden sowohl Zellen aus der Nabelschnurvene als auch aus der Nabelschnurarterie sowie eine Mischpopulation aus der gesamten Nabelschnur isoliert. Alle Zellen zeigten die Morphologie von Myofibroblasten bei einer den venösen Zellen vergleichbaren Gewebeentwicklung.

Es lassen sich also arterielle und venöse Biopsien, Knochenmarksbiopsien und die Nabelschnur als Quellen für Myofibroblasten nutzen. Dies gestattet eine große Flexibilität in der Auswahl der für den Patienten geeigneten Methoden.

Bereits 1988 führten Wagner et al. entsprechende Untersuchungen zu venösen und arteriellen Endothelzellen durch [101]. Sie isolierten Endothelzellen aus der Aorta und Vena Cava von Schafen, vermehrten diese *in vitro* und verglichen die Proteinexpression zum einen mittels Elektrophorese des Zelllysates und zum anderen durch die quantitative Bestimmung der cytoskellletalen Proteine alpha- und beta-Tubulin.

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

Die Expression der Tubuline durch arterielle Endothelzellen stellte sich dabei als signifikant höher heraus als die venöser Zellen. In der Proteinelektrophorese konnten Wagner et al. 257 Proteine nachweisen, deren Expression zwischen venöser und arterieller Zellquelle signifikante Unterschiede aufweist.

Noch deutlicher unterscheidet sich der Phänotyp kapillärer Endothelzellen von venösen und arteriellen Zellen. Sage et al. wiesen Unterschiede im Expressionsmuster der Collagene zwischen diesen Zelltypen nach [79]. In Kultur synthetisieren nur venöse und arterielle Endothelzellen Collagen IV und V, nicht aber kapilläre Endothelzellen.

Diese Untersuchungen zeigen klare Unterschiede zwischen Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft; ob diese Unterschiede in der klinischen Anwendung des Tissue Engineerings eine Rolle spielen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beurteilt werden. In anderen Bereichen zeigen sich in der klinischen Anwendung venöser und arterieller Gewebequellen allerdings deutliche Unterschiede; so neigen Koronarby-pässe venöser Herkunft wesentlich früher zu Stenosen als solche arteriellen Ursprungs, wobei die Gewebearchitektur sich auch im Hinblick auf Compliance und die Bestandteile der extrazellulären Matrix zwischen Arterie und Vene unterscheidet. Arterielle und venöse Endothelzellen können also nicht ohne weitere Beurteilung als gleichwertige Zellquellen betrachtet werden. Deshalb erscheint die Nabelschnurarterie im Hinblick auf klinische Anwendbarkeit und Zellphänotyp als die aktuell am besten geeignete Zellquelle für das valvuläre Tissue Engineering.

3.4.2 Scaffolds

Um ein Neotissue in Form einer Semilunarklappe zu erzeugen, ist ein Stützskelett erforderlich. Ein solcher Scaffold sollte nach Mol et al. idealerweise folgenden Ansprüchen genügen [63]. Er sollte:

3.4 Komponenten des Cardiovasculären Tissue Engineerings

1. reproduzierbar sein, um seine Verfügbarkeit garantieren zu können.
2. porös sein, um die Versorgung der Zellen zu gewährleisten.
3. im Hinblick auf Zellwachstum und auch auf die spätere Implantation weder cytotoxische Effekte auf Zellen in Kultur ausüben noch Entzündungsreaktionen oder toxische Effekte im menschlichen Körper auslösen.
4. kontrollierbar oder zumindest proportional zur Matrixsynthese durch die eingebrachten Zellen biodegradierbar sein, um nicht das Wachstumspotential einer Klappe einzuschränken.
5. in Form einer Herzklappe zu bringen und mechanisch stabil genug sein, um eine Implantation oder weitere Kultur zum Beispiel in einem Bioreaktorsystem zu ermöglichen.

Unter diesen Gesichtspunkten sollen im Folgenden verbreitete Biomaterialien für das cardiovasculäre Tissue Engineering beurteilt werden.

3.4.2.1 Acellularisierte Matrices

Glutaraldehydfixierte Klappen haben, wie bereits beschrieben, eine Reihe von Nachteilen, die größtenteils auf die dem Fixationsprozeß innewohnende Quervernetzung der Kollagenfasern der Extrazellulären Matrix zurückzuführen sind (vgl. 3.2.2). Sie haben jedoch den großen Vorteil, der natürlichen Klappe in Form und Biomechanik zu entsprechen [66]. Es liegt also nahe, lediglich zelluläre Bestandteile als Haupterreger immunologischer Reaktionen aus der Klappe zu entfernen und die Extrazelluläre Matrix soweit als möglich unfixiert zu erhalten. Denn diese hat eine geringe Immunogenität, selbst bei xenogener Anwendung dieses Verfahrens, da zum Beispiel Kollagen eine große Homologie über Speziesgrenzen hinweg aufweist [13].

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

Ausgehend von diesen Überlegungen wurden verschiedene Protokolle zur Decellularisierung entwickelt. Bader und Haverich [4] stellten 1998 ein Verfahren unter Verwendung des Detergens Triton vor, durch welches Zellbestandteile fast komplett entfernt werden konnten. Die Bindegewebsmatrix erschien lichtmikroskopisch allerdings deutlich aufgelockert.

Ein komplexeres Verfahren [104], welches in kompletter Entfernung der Zellen resultiert, stellten Wilson et al. bereits drei Jahre früher vor. Sie inkubierten das Gewebe zunächst in hypertonen und hypotonen Lösungen, setzten es danach den Detergentien Octyl-Phenoxy-Polyoxyethanol und Natriumdodecylsulfat aus und entfernten Nukleinsäurereste durch RNase und DNase.

Ähnlich effektiv zeigte sich die 2000 von Bader und Haverich [90] eingeführte Decellularisierung auf der Basis einer Trypsin- / EDTA-Lösung, die trotz einfacherem Vorgehen gute Ergebnisse im Hinblick auf die Zellfreiheit zeigte.

Bei allen Verfahren konnten die biomechanischen Eigenschaften der Klappen bewahrt werden [8].

Diese decellularisierten Matrices können auf zwei Arten verwendet werden. Zum einen können sie, ähnlich einer biologischen Klappenprothese, direkt implantiert werden. Im Körper des Empfängers wird die eingepflanzte Matrix dann, so die Überlegung, von körpereigenen Zellen besiedelt und die fremden Matrixproteine mit der Zeit durch körpereigene ersetzt.

Tierversuche haben die grundsätzliche Durchführbarkeit dieses Verfahrens bestätigt [104], aber bei längerer Verweildauer der Implantate zeigte sich in Versuchen von Walles et al. [103] eine schnelle calcifizierende Degeneration acellularisierter cardiovascularer Strukturen bei ungenügender Recellularisierung.

3.4 Komponenten des Cardiovasculären Tissue Engineerings

Auch die klinische Anwendung acellularisierter Scaffolds wurde in jüngerer Zeit von Misserfolg begleitet: Die kommerziell erhältliche acellularisierte Klappe SYNERGRAFT wurde vier pädiatrischen Patienten implantiert; drei von diesen versagten, die vierte wurde prophylaktisch entfernt [86]. Histologisch ließ sich eine starke Fremdkörperreaktion nachweisen.

Acellularisierte Matrices können auch als Scaffold für Zellbesiedlung dienen; da sie dem natürlichen Umfeld kardiovaskulärer Strukturen entsprechen, sollten sie dafür gut geeignet sein. Auch dieser Weg wurde von unterschiedlichen Ergebnissen begleitet: *In-vitro*-Studien konnten keine komplette Recellularisierung zeigen, und im Tierversuch ergaben sich trotz kompletter Zellbesiedlung wiederum Anzeichen kalzifizierender Entzündungsreaktionen mit Verdickung der Klappensegel [90].

Die klinische Anwendung dieses Verfahrens zeigt allerdings ermutigende Ergebnisse: Haverich et al. [12] implantierten 2003 mit endothelialen Vorläuferzellen besiedelte acellularisierte Matrices bei 2 Kindern in Pulmonalisposition. Das Mitte 2006 publizierte 3,5 Jahres-Follow-up zeigte in beiden Fällen funktionsfähige Klappen ohne sonographische Zeichen der Degeneration. Der Durchmesser des Pulmonalklappenannulus vergrößerte sich in dieser Zeit von 18 auf 22,5 mm beziehungsweise von 22 auf 26 mm. Dies kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass eine der wesentlichen Hoffnungen, die auf valvulärem Tissue Engineering ruhen, nämlich einen Klappenersatz mit Wachstumspotential herzustellen, erfüllt werden kann. Andererseits kann dies auch als ein Zeichen der Gefügedilatation der Extrazellulären Matrix aufgefaßt werden. Eine histologische Aufarbeitung zur Beurteilung einer Fremdkörperreaktion konnte selbstverständlich bei funktionsfähigen Klappen nicht erfolgen.

Die beschriebenen Versuche zeigen deutlich die Schwierigkeit, Ergebnisse aus Tierversuchen auf den Menschen zu übertragen. Die star-

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

ke Fremdkörperreaktion auf die SYNERGRAFT-Klappen weist darauf hin, dass die Gewebematrix der Klappen trotz Entfernung der Zellen für eine Implantation beim Menschen noch zu immunogen sein könnte, auch wenn bei Tierversuchen keine derart starken Reaktionen nachgewiesen werden konnten.

Durch längere *In-vitro*-Kultur nach vorheriger Besiedlung kann versucht werden, den Anteil der durch eingebrachte Zellen produzierten Matrixproteine zu erhöhen. Die Degradation der Bindegewebsmatrix ist allerdings nicht steuerbar; um die komplette Gewebestruktur auszutauschen, werden Kulturdauern von bis zu 24 Monaten angegeben [103].

Decellularisierte Klappen scheinen also den in 3.4.2 angegebenen Kriterien nur bedingt zu genügen: trotz optimaler Eigenschaften in Bezug auf Form, Stabilität, Reproduzierbarkeit und Porosität scheinen sie dem Anspruch der Biokompatibilität nicht zu genügen. Dies wird noch unterstützt durch die Gefahr der Infektionsübertragung, da in decellularisierten Scaffolds porcine Retroviren gefunden wurden [102].

3.4.2.2 Synthetische Polymere

Biodegradierbare synthetische Polymere weisen gegenüber biologischen Strukturen wesentliche Vorteile auf: sie können genau reproduzierbar hergestellt werden und weisen immer die gleichen Eigenschaften auf [8]. Ihre Porosität ist vollständig definiert und kann durch Änderung der Zusammensetzung oder des Produktionsprozesses angepaßt werden. Im Bereich der Biokompatibilität beginnen synthetische Polymere jedoch an ihre Grenzen zu stoßen: Polymere aus Polyglykol, Polylactid oder deren Kombinationspolymere, die seit langem als resorbierbares Nahtmaterial eingesetzt werden, sind dafür bekannt, eine starke Entzündungsreaktion hervorzurufen, da sie im Rahmen ihrer Degradation zu einer starken Übersäuerung ihrer Umgebung führen können [98].

3.4 Komponenten des Cardiovasculären Tissue Engineerings

Shinoka et al. [85] konnten die grundsätzliche Eignung synthetischer Polymere für das valvuläre Tissue Engineering schon 1995 im Tierversuch nachweisen, indem sie das posteriore Segel der Pulmonalklappe eines Schafes durch ein tissue-engineertes Segel ersetzten. Sie nutzten hierfür ein Non-Woven-Mesh auf Basis des Polymers Polyglykolsäure (PGA), welches sie in statischer Kultur mit interstitiellen und endothelialen Zellen aus der *Arteria femoralis* desselben Schafes besiedelten.

Sechs Wochen nach Implantation konnte das implantierte Klappensegel makroskopisch verdickt aufgefunden werden. Histologisch zeigte sich eine beginnende Entwicklung extrazellulärer Matrix, aber auch eine starke Entzündungsreaktion.

In einer zweiten Versuchsreihe implantierten Shinoka et al. 6 besiedelte und 2 unbesiedelte Scaffolds nach vorheriger siebentägiger *In-vitro*-Kultur. Die besiedelten Segel hielten durchweg den Belastungen in Pulmonalklappenposition stand, meist jedoch mit einem geringen Grad an Stenose oder Insuffizienz. Die unbesiedelten Scaffolds konnten 8 Wochen nach Implantation nicht mehr nachgewiesen werden, während die besiedelten über eine maximale Verweildauer von 11 Wochen zunehmende Kollagenproduktion und eine konfluente Endothelzellbeschichtung zeigten. Lichtmikroskopisch konnte der Scaffold zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden. Leider machen die Autoren keine Aussage zu entzündlichen Reaktionen innerhalb des implantierten Gewebes.

Um eine solche Entzündungsreaktion zu vermeiden, ist eine längere *In-vitro*-Kultur vor Implantation ein gangbarer Weg. Diese müsste erfolgen, bis das Polymer nicht mehr im sich entwickelnden Gewebe nachweisbar ist; die Zerfallszeiten der mechanisch geeigneten Polymere liegen allerdings bei 10 bis 52 Wochen [92] was sehr lange Kulturzeiten nötig macht, obwohl die stützende Funktion des Scaffolds aufgrund eines Abfalls der mechanischen Stabilität bei vielen Polymeren schon

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

nach 2 bis 4 Wochen verloren geht.

Die Formgebung synthetischer Polymere stellt ein weiteres Problem dar. Solange (wie in der oben beschriebenen Arbeit von Shinoka et al. [85]) nur einzelne Segel ersetzt werden, können diese problemlos aus einem Gewebe oder einem Non-Woven-Mesh hergestellt werden. Die Fertigung eines kompletten Ausflußtraktes stellt eine deutlich größere Schwierigkeit dar; hier ist die Nutzung von Geweben oder vliesartigen Strukturen kaum mehr möglich.

Polyhydroxybutyrat als thermoplastisches Material kann durch Pressen oder Spritzguß verarbeitet werden [63] und ist so einer exakten Formgebung deutlich leichter zugänglich, auch wenn die Fertigung eines kompletten Ausflußtraktes inklusive der Aushöhlungen der *Sinus valsalvae* in der für Kinder nötigen Größe schwierig bleibt [92].

Sodian et al. [88] stellten 2002 einen vielversprechenden Lösungsansatz vor. Sie erstellten mit Hilfe einer Computertomographie ein Computermodell der zu ersetzenden Klappe und fertigten mit Hilfe von Rapid Prototyping ein exaktes Abbild aus einem Copolymer von Poly-4-Hydroxybutyrat und Polyhydroxyoctanoat. Dabei wird durch Laserlicht an definierten Punkten die Polymerisation einer Pulverschicht der Polymerbestandteile angeregt und der Rest des Pulvers weggeblasen. Danach wird Pulver für die nächste Schicht aufgetragen und so Schicht für Schicht eine komplexe dreidimensionale Struktur aufgebaut.

Zusammenfassend haben synthetische Polymere ohne Zweifel Vorzüge im Bereich der Reproduzierbarkeit und Definierbarkeit ihrer Eigenschaften und erlauben die Produktion autologer Klappenstrukturen, jedoch scheint keines der bisher verwendeten Polymere die Anforderungen an Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit und Formbarkeit optimal zu erfüllen.

3.4.2.3 Biologische Polymere

Als dritte Gruppe der sich als Scaffold eignenden Materialien zeigen sich die biologischen Polymere Kollagen und Fibrin.

Die Fertigung eines Scaffolds in Form einer Herzklappe ist ein wesentliches Problem sowohl bei der Verwendung synthetischer (vgl. 3.4.2.2) als auch biologischer Polymere. Wie bei synthetischen Polymeren stößt die Verwendung von Kollagen [75] und Fibrin als Faden beziehungsweise Gewebe in der Herstellung des kompletten Ausflußtraktes eines Ventrikels an Grenzen.

Ähnlich den synthetischen Polymeren bieten auch die biologischen Polymere andere Verarbeitungsmöglichkeiten. Taylor et al. [94] stellten einen mit interstitiellen Zellen aus Herzklappen besiedelten Kollagenschwamm vor, in dem unter *In-vitro*-Bedingungen Zellvermehrung und die Entwicklung extrazellulärer Matrixproteine stattfand. Rothenburger et al. [76] erzielten ähnliche Ergebnisse mit Hilfe eines valvulären Scaffolds aus Kollagenschaum. Auch das Rapid Prototyping ist im Bereich der biologischen Polymere unter Abwandlung des Verfahrens anwendbar, indem nicht Energie in Form von Hitze sondern enzymatische Vorgänge zur Polymerisation eingesetzt werden.

Sowohl Kollagen [38] als auch Fibrin [105] lassen sich als schnell polymerisierende Gelstrukturen herstellen. Jockenhoevel et al. entwickelten ein Spritzgußverfahren für Fibrin, welches die Herstellung von Scaffolds sowohl für Gefäße [41] als auch für Herzklappen [42] ermöglicht. Dabei wird ein flüssiges Polymerisatgemisch in eine Gußform eingefüllt und Thrombin als Starterenzym zugesetzt, woraufhin das Gel innerhalb weniger Minuten auspolymerisiert. Dieses Verfahren kann im Gegensatz zur Herstellung von Scaffolds aus synthetischen Polymeren unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

Wie für synthetische Polymere und acellularisierte Matrices beschrie-

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

ben, stellt die Implantation des Scaffolds oder seiner Reste immer ein Risiko für Entzündungsvorgänge oder Infektionsübertragungen dar. Kollagen ist unter diesem Gesichtspunkt kritischer, da es in ausreichender Menge nur xenogen gewonnen werden kann. Fibrinogen dagegen läßt sich leicht aus dem Blut des Patienten gewinnen [54]. Trotzdem ist die Möglichkeit einer entzündlichen Reaktion bei beiden Proteinen gegeben.

Hier bietet sich ebenso wie für synthetische Polymere und acellularisierte Matrices eine ausreichend lange Zeit der Kultur *in vitro* an, bis alle Scaffoldbestandteile abgebaut sind. Die Degradationszeit von Kollagen ist mit 5 bis 50 Wochen zu lange und variabel für eine *In-vitro*-Kultur [72]. Fibrin dagegen wird von Zellen schnell abgebaut. Die Degradation eines Scaffolds auf dieser Basis ist deshalb durch den Zusatz eines Proteinaseinhibitors genau steuerbar [92] und kann so der Neuentwicklung von Gewebe individuell angepaßt werden.

Die Anwendung von Fibrin gel im Bereich des cardiovasculären Tissue Engineerings stößt auf zwei Hauptprobleme:

Zum einen reicht die initiale Stabilität der gegossenen Strukturen zwar aus, um sie einzunähen, würde den Belastungen einer direkten Implantation aber nicht standhalten [42]. Außerdem würde ein Scaffold aus Fibrin gel im Körper sofort abgebaut. Deshalb ist die Kultur *in vitro* vor Implantation unumgänglich.

Zum anderen schrumpfen tissue-engineerte Gewebe auf der Basis biologischer Polymere im Verlauf der Kultur, insbesondere während der ersten Tage [17]. Dieser Prozeß wird wahrscheinlich durch die in den Scaffold eingebrachten Myofibroblasten, die sich, analog den Prozessen bei der Entwicklung einer Narbe, zusammenziehen [40]. Zusätzlich führt der Matrixumbau mit Abbau der Polymere und Synthese von Kollagen auch zu Schrumpfungsprozessen [17].

Diese Prozesse verändern die Geometrie der gegossenen Strukturen und

verhindern so die Entwicklung einer funktionsfähigen Klappe.

Andererseits führen Spannungen innerhalb des tissue-engineerten Gewebes zu einer beschleunigten Gewebeentwicklung [44]. Aus diesem Grund erscheint es bei adäquater Fixation des Gewebes möglich, die stattfindenden Umbauprozesse zur Verbesserung der Gewebeentwicklung einzusetzen.

Zusammenfassend erscheint also Fibringel unter den Aspekten Formbarkeit, Reproduzierbarkeit, Biokompatibilität und Biodegradibilität als ein sehr gut geeignetes Material und soll aus diesem Grund in dieser Arbeit weiter in seinen Eigenschaften als Scaffold für valvuläres Tissue Engineering untersucht werden.

3.4.2.4 Zellbesiedlung

Allen Scaffolds gemein ist die Notwendigkeit, interstitielle Zellen in die erzeugte Stützstruktur hinein- und endotheliale Zellen auf sie aufzubringen.

Shinoka et al. [85] begannen 1995 damit, ihre Polymerstrukturen zunächst in einer Myofibroblastensuspension und danach in einer Endothelzellsuspension statisch zu kultivieren. Die Myofibroblasten wandern, so die Überlegung, nachdem sie sich auf der Oberfläche abgelagert haben, in den Scaffold ein, während die Endothelzellen eine konfluente Zellschicht an der Oberfläche formen.

Solche statischen Besiedlungsverfahren sind mit hohem Zellverlust behaftet [92], denn

1. die Zellen lagern sich auf einer Seite des Scaffolds und am Boden des Kulturgefäßes ab, bis der Scaffold manuell gewendet wird.
2. die Adhäsion von Zellen an synthetischen Scaffolds ist mit Schwierigkeiten verbunden.

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

Die Anwendung dynamischer Besiedlungsmethoden, die auf der Bewegung des Scaffolds in verschiedenen Raumrichtungen während des Besiedlungsverfahrens beruhen, kann die Zellausbeute bei der Scaffoldbesiedlung verbessern [92].

Jockenhoevel et al. [105] konnten die Notwendigkeit der Besiedlung mit intersititellen Zellen umgehen, indem sie die Zellen direkt bei der Formgebung in den Scaffold integrierten. Sie nutzen dazu das biologische Polymer Fibrin, dessen lösliche Komponente Fibrinogen durch die Zugabe von Thrombin und Calciumchlorid schlagartig polymerisiert. Die Zellen werden direkt dem Polymerisationsgemisch beigelegt, so dass eine gleichmäßige Verteilung resultiert und keine Zellen verloren gehen.

Eine Zellbesiedlung ist also bei einem auf diese Art zu verarbeitenden Material sehr leicht durchzuführen. Fibrinogen ist bisher das einzige für diese Anwendung optimierte Polymer, obwohl jedes Material, das sich steril als Gel verarbeiten lässt, ähnlich besiedelt werden könnte.

3.4.3 Bioreaktoren

3.4.3.1 Notwendigkeit von Bioreaktoren

Eine mit Zellen besiedelte Stützstruktur ergibt neues, körpereigenes Gewebe, so das bereits beschriebene Ziel des Tissue Engineerings (vgl. 3.1). Dieses neu gewonnene Gewebe soll Funktionen des gesunden menschlichen Organismus übernehmen, hier im Speziellen die Funktion einer Herzklappe. Ob es allerdings günstig ist, einen mit Zellen besiedelten Scaffold direkt den physiologischen Belastungen an der Stelle der menschlichen Pulmonalklappe auszusetzen, ist eine offene Frage.

Für eine sofortige Implantation spricht die grundsätzliche Präsenz aller für die Entwicklung eines Gewebes notwendigen biochemischen

3.4 Komponenten des Cardiovasculären Tissue Engineerings

und biomechanischen Signale im menschlichen Körper [97]. Ob allerdings die Bedingungen im kindlichen oder erwachsenen menschlichen Körper günstig für die Entwicklung tissue-engineerter cardiovasculärer Strukturen sind, muss diskutiert werden, da die Bedingungen im Körper eines Erwachsenen oder Kindes die Bedingungen der Regeneration und nicht der Neuentwicklung von Gewebe darstellen.

Der Großteil der Neuentwicklung der cardiovasculären Strukturen findet in der Embryonalzeit statt [59], abgesehen von angiogenetischen Prozessen im Rahmen der Geweberegeneration oder Tumorwachstum. Die Semilunarklappen im speziellen sind bereits zum Ende der 16. Schwangerschaftswoche vollständig entwickelt (vgl. 2.1).

Vor diesem Hintergrund formulierten Stock und Vacanti [91] die These, dass eine optimale Gewebeentwicklung im Bereich des Tissue Engineerings durch die Nachahmung fetaler Bedingungen zu erzielen ist. Dies wird insbesondere durch Ergebnisse von Lee et al. [55] unterstützt, die bei sehr niedrigen Scherkräften weit unter dem Niveau im erwachsenen oder kindlichen Körper niedrigere Expression des Enzyms Matrixmetalloproteinase durch Myofibroblasten beobachten konnten. Da dieses Enzym für den Abbau von Kollagen nötig ist, ist seine starke Expression, wie sie bei starker mechanischer Belastung induziert wird, zu Beginn der Kultur für das Tissue Engineering nicht günstig.

Eine Kultur *in vitro* vor Implantation führt durch die stattfindende Gewebeneubildung außerdem zu einer erhöhten mechanischen Stabilität der implantierten Strukturen. Dies ist insbesondere bei der Verwendung synthetischer oder biologischer Polymere als Scaffoldmaterial wichtig, da diese nur eine geringe mechanische Stabilität aufweisen. Insbesondere die Verarbeitung des in dieser Arbeit verwendeten Fibrins als Gel macht eine Kultur *in vitro* aus Stabilitätsgründen unumgänglich.

Aus diesen Überlegungen erscheint die Nutzung eines Bioreaktorsystems zur *In-vitro*-Kultur tissue-engineerter Gewebe sinnvoll. Deshalb

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

sollen im folgenden die Anforderungen an ein solches System formuliert, darauf aufbauend die Grundsätze des Bioreaktordesigns für cardiovascular Strukturen dargelegt und schließlich die aktuellen Entwicklungen in diesem Bereich vorgestellt werden.

3.4.3.2 Anforderungen an Bioreaktoren

Ein Bioreaktor kann nach Barron et al. [5] als ein System definiert werden, das physiologische Umgebungen mit dem Ziel der Herstellung, der physikalischen Konditionierung und der Testung von Zellen, Geweben, Organen und deren Vorstufen und Stützstrukturen nachahmt. Nach Freed [25] sollte ein solcher Bioreaktor wenigstens eine der folgenden Aufgaben erfüllen können:

1. eine gleichmäßige Verteilung von Zellen in einem dreidimensionalen Scaffold sicherstellen.
2. die gewünschte Konzentration von Gasen und Nährstoffen im Kulturmedium aufrechterhalten.
3. dem sich entwickelnden Gewebe einen ausreichenden Massentransport zur Verfügung stellen.
4. das wachsende Gewebe physikalischen Stimuli aussetzen.
5. Informationen über die Gewebsentwicklung liefern.

3.4.3.3 Statische Kulturmethode

Der einfachste mögliche Bioreaktor im weitesten Sinne ist die Zellkulturflasche, auch wenn sie nur die Kultur von adhärennten Monolayern erlaubt. Unter statischen Bedingungen kann hier durch die große Oberfläche, auf die sich Zellen und Medium verteilen, ein Gasaustausch in

3.4 Komponenten des Cardiovasculären Tissue Engineerings

ausreichendem Maße gewährleistet werden. Dabei besteht ein Konzentrationsgefälle von Gasen und Nährstoffen im Medium: die Konzentration von Nährstoffen und O_2 nimmt in Richtung auf die Zellschicht ab, wogegen die Konzentration von CO_2 und Stoffwechselprodukten in Richtung auf die Zellschicht zunimmt. Aufgrund der geringen Schichtdicke des Mediums über einer Einzelzelllage spielen diese Gefälle bei zweidimensionaler Zellkultur allerdings keine Rolle. Die durchsichtigen Kulturflaschen erlauben die direkte Beobachtung der lebenden Zellen unter einem Polarisationsmikroskop.

Bei der Übertragung dieser Methode auf die dreidimensionale Zellkultur zum Beispiel einer Herzklappe fällt zunächst ein Problem ins Auge: Um eine Herzklappe komplett einem Kulturmedium auszusetzen, sind größere Mengen dieses Mediums notwendig. Dadurch erhöhen sich die Strecken, über die Konzentrationsgefälle auftreten, und die Oberfläche des Mediums vermindert sich relativ zum Volumen. Eine statische Kultur genügt aus diesem Grund den Nährstoffansprüchen eines dreidimensionalen Gewebes nicht.

3.4.3.4 Dynamische Kulturmethoden für cardiovasculäre Strukturen

Um die Konzentrationsgefälle im Nährmedium (insbesondere in der dem Gewebe anliegenden Schicht) aufzuheben und den Gasaustausch zu verbessern, ist das einfachste dynamische System ein Magnetrührer, durch den das Medium ständig durchmischt wird. Allerdings führt der ungerichtete Fluss in einem gerührten System durch zufällige biomechanische Stimulation des Gewebes zu strukturell inadäquaten und uneinheitlichen Strukturen [25]. Dies hat zu der Entwicklung von dynamischen Bioreaktorsystemen geführt, die ein sich entwickelndes Gewebe definierten und wiederholt applizierbaren Stimuli aussetzen.

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

Im Bereich der dynamischen Bioreaktorsysteme für Herzklappen finden Systeme Anwendung, die versuchen, den physiologischen Belastungsablauf einer Semilunarklappe, also das Öffnen und Schließen unter pulsatilem Fluß, nachzustellen [5]. Dabei sind Druck, Fluss und Frequenz, unter denen eine optimale Gewebsentwicklung erfolgt, völlig spekulativ.

Biomimetische, pulsatile Bioreaktorsysteme für cardiovasculäre Strukturen, seien es Herzklappen oder Gefäßprothesen, arbeiten alle nach einem gemeinsamen Schema [5] (vgl. Abbildung 3.5): Eine Pumpe, die,

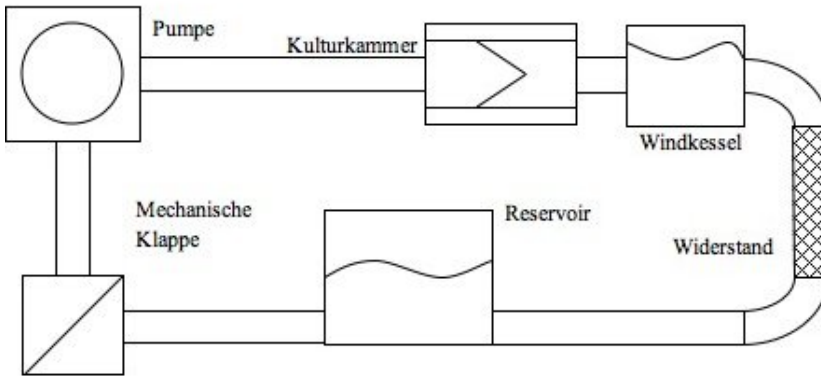


Abbildung 3.5: Bioreaktoren für cardiovasculäre Strukturen

ähnlich einem Ventrikel des Herzens, einen pulsatilem Fluß erzeugt, ist der zu kultivierenden Struktur vorgeschaltet. Hinter der Gewebestruktur finden sich ein Windkessel und ein Widerstand, durch die physiologische Kreislaufverhältnisse nachgeahmt werden können. Über ein Reservoir und eine mechanische Klappe, die zur Richtung des Flusses dient, gelangt die Kulturflüssigkeit zurück zur Pumpe. Zusätzlich muss in diesem Kreislauf an jedem beliebigen Punkt der Gasaustausch sichergestellt werden.

3.4.3.5 Bioreaktorsysteme für das valvuläre Tissue Engineering

Basierend auf dieser Grundstruktur sind für das valvuläre Tissue Engineering bisher zwei Bioreaktorsysteme entwickelt und beschrieben worden: Hoerstrup et al. [36] beschreiben ein System, das Pumpenfunktion, Halterung für das Gewebe und Flußausrichtung zusammenfaßt. In einem vertikal ausgerichteten Dreikammersystem befindet sich die

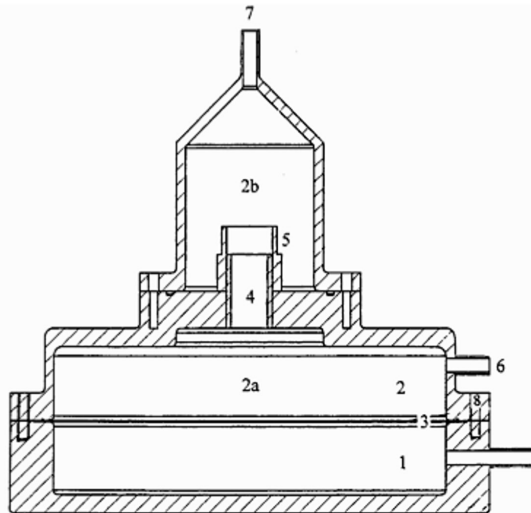


Abbildung 3.6: Bioreaktor nach Hoerstrup [36]

1 – Druckkammer, 2a – ventrikuläre Kammer, 2b – Ausstrombahn, 3 – flexible Membran, 4 – zu kultivierende Klappe, 5 – Kulturrkammer, 6 – Mediumeinlaß, 7 – Mediumauslaß

Semilunarklappe (4) in einem Verbindungskanal (5) zwischen oberster (2b) und mittlerer (2a) Kammer. Die Klappe aus synthetischem Polymer wird zur Befestigung im Reaktor in einen Silikonschlauch mit einem Durchmesser zwischen 16 und 26 mm eingenäht, welcher dann zwischen oberster und mittlerer Kammer in nicht näher beschriebener Art und Weise eingesetzt wird. Die untere Kammer (1) steht mit

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

einem Beatmungsgerät in Verbindung, dessen Druckänderungen eine flexible Membran (3) zwischen unterer und mittlerer Kammer auslenken. Wenn nun die obere und die mittlere Kammer über mechanische Klappen und Silikonschläuche mit einem Reservoir verbunden werden, führt die Auslenkung der Membran zu einem gerichteten, pulsatilen Fluß über die Klappe. Nach Aussage der Autoren können mit diesem System unter verschiedenen physiologischen Schlagfrequenzen Flußraten zwischen 50 und 2000 mL/min bei Drücken von 10 bis 240 mmHg erzeugt werden. Allerdings besteht die Verbindung von der mittleren (2a) zur Kulturkammer (5) aus einer Bohrung mit einem Durchmesser von nur 4 mm. Der Übergang von einer solchen Bohrung zu einer Kammer mit größerem Radius kann als Stufendiffusor beschrieben werden. Dabei kommt es bei einem plötzlichen Übergang von einer Röhre mit engem Durchmesser zu einer Röhre mit größerem Durchmesser im Bereich der Übergangszone zur Wirbelbildung (vgl. Abbildung 3.7) . Dies

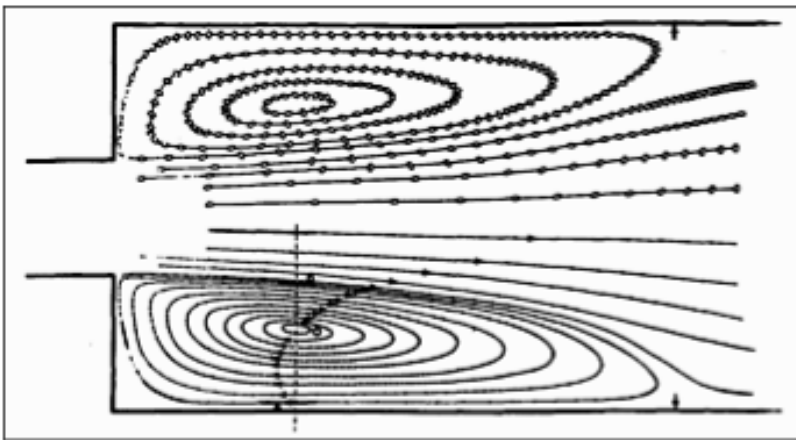


Abbildung 3.7: Plötzliche Rohrerweiterung mit annulärer Wirbelbildung [48]

kommt der Entstehung von ungerichtetem Fluß gleich und ist für die Gewebsentwicklung als ungünstig zu bewerten (vgl. 3.4.3.4).

3.4 Komponenten des Cardiovasculären Tissue Engineerings

Dumont et al. [19] beschreiben einen Bioreaktor (vgl. Abbildung 3.8), der zusätzlich die Elemente Windkessel und Widerstand enthält. Ihr

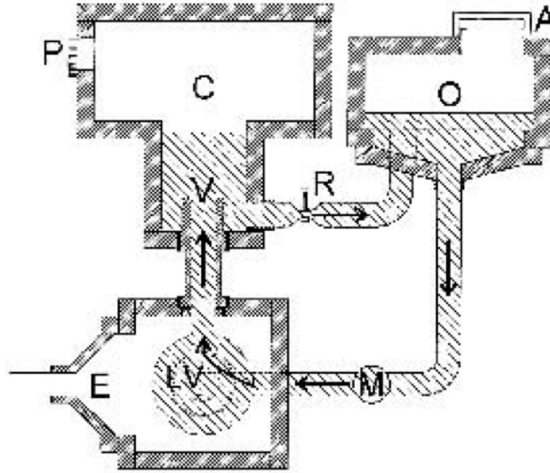


Abbildung 3.8: Bioreaktor nach Dumont [19]

LV – Ventrikel mit Silikonball, V – Kulturkammer, C – Windkessel, O – Reservoir, A – Belüftung, M – mechanische Klappe, R – Schlauchklemme, P – Druckaufnehmer

System besteht aus vier Einzelkomponenten, die über Schläuche miteinander in Verbindung stehen. Der Ventrikel besteht hier aus einem Silikonball (LV) mit Zufluß und Abfluß, der in einer Kammer hängt, die von außen unter Druck gesetzt werden kann und so eine Pumpfunktion ermöglicht. Komponente V beinhaltet eine Halterung für die zu kultivierende Semilunarklappe mitsamt des Windkessels (C), der aus einem Liter Luft über der in Medium befindlichen Klappe besteht. In den Kreislauf sind noch ein Reservoir (O) mit Belüftung (A) und eine mechanische Klappe (M) zur Erzeugung eines gerichteten Flusses eingebunden. Der Widerstand wird über eine Schlauchklemme (R) zwischen Windkessel und Reservoir erzeugt. Um die in diesem System erzeugten Druckverhältnisse zu steuern, steht der Windkessel mit ei-

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

nem Druckaufnehmer (P) in Verbindung. Auch in diesem System können Frequenz und Fluß, aber auch Widerstand und Windkessel in weiten Grenzen variiert werden. Dadurch können nahezu physiologische Druckverhältnisse über der Klappe erzeugt werden.

3.4.3.6 Vergleich der Bioreaktorsysteme für Herzklappen

Diese beiden Systeme sollen nun abschließend unter den von Freed genannten Gesichtspunkten beurteilt und daraus Anforderungen an ein Bioreaktorsystem für Semilunarklappen auf Fibringelbasis erarbeitet werden.

1. In den beschriebenen Bioreaktorsystemen kann kein Cell-Seeding vorgenommen werden; dies ist jedoch, wie bereits beschrieben, für diese Arbeit nicht relevant, stellt allerdings für das Tissue Engineering mit synthetischen Polymeren oder decellularisierten Scaffolds einen Nachteil dar.
2. Der Gasaustausch über Belüftung des Reservoirs, wie Dumont et al. es vorschlagen, ist mit Sicherheit möglich, stellt jedoch keine gut kontrollierbare Methode dar. Nährstoffe können über Austausch des Kulturmediums zugeführt werden; dessen leichte Durchführbarkeit ist wahrscheinlich bei beiden Systemen gegeben, auch wenn keine Methode beschrieben ist. Ein weiterer Punkt, die Qualität des Mediums betreffend, ist die Sterilität des Systems. Aufgrund der einfacheren Konstruktion des Bioreaktors der Gruppe um Hoerstrup erscheint dieser leichter steril zu handhaben.
3. Ein ausreichender Massentransport im Sinne einer guten Durchmischung der Grenzschicht des Mediums zum Gewebe ist bei dem von Dumont et al. vorgestellten System sicher gewährleistet.

3.4 Komponenten des Cardiovasculären Tissue Engineerings

Das System der Gruppe um Hoerstrup ist durch Verbindungskanal von 4 mm Durchmesser in diesem Punkt als problematisch zu betrachten.

4. Auch physikalischen Stimuli können die Neotissues in beiden Systemen ausgesetzt werden; doch erscheint das System von Dumont et al. hier weitergehende Variabilität zu ermöglichen, da es durch den Einsatz von Windkessel und Widerstand physiologische Bedingungen sehr genau nachzuahmen vermag. Dabei steht jedoch, wie bereits angedeutet, zur Diskussion, ob der Zweck eines Bioreaktorsystems die genaue Nachahmung physiologischer Verhältnisse sein soll. Die Annahme Stock und Vacantis [91], fetale Bedingungen seien für das Tissue Engineering von Herzklappen gut geeignet, wurde bisher nur insoweit durch Experimente unterstützt, als dass niedriger Scherstress in den ersten Kulturtagen förderlich für die Gewebeentwicklung ist. Für längere Kultur dauern sind bisher keine Ergebnisse publiziert worden, die hier eine eindeutige Empfehlung zulassen. Wichtig ist aber sicherlich, Kulturbedingungen genau reproduzieren zu können, um vergleichbare Kulturergebnisse zu gewinnen.
5. Informationen über die Gewebeentwicklung vermögen beide Systeme auf makroskopischer Ebene über eine durchsichtige Kulturkammer zu geben, indem sie Sicht auf die Klappe gestatten.

3 Grundlagen des valvulären Tissue Engineerings

4 Optimierung des Tissue Engineering von Herzklappen auf Fibringelbasis

Das cardiovasculäre Tissue Engineering mit Fibringel als Scaffoldmaterial erweitert das grundlegende Prinzip des Tissue Engineerings (vgl. Kapitel 3.1) um die autologe Scaffoldgewinnung. Nicht nur das zu implantierende Gewebe als Endprodukt soll dem Gewebe des Patienten gleichen, sondern auch der Scaffold wird aus körpereigenem Material hergestellt. Dazu wird parallel zur Gewebebiopsie eine Blutprobe des Patienten gewonnen, aus der das zur Herstellung eines Fibringels benötigte Fibrinogen isoliert werden kann. Aus der Gewebebiopsie werden Endothelzellen und Myofibroblasten gewonnen und in Kultur vermehrt. Steht eine ausreichende Anzahl Zellen zur Verfügung, so werden diese in einem calciumfreien Puffer suspendiert und zusammen mit der Fibrinogenlösung in eine Gussform gegeben. Durch Zugabe von Calciumchlorid und Thrombin wird die Polymerisation von Fibrinogen zu einem Fibringel gestartet. Dabei spaltet Thrombin in Gegenwart von Calciumchlorid ein Stück des Fibrinogens ab; das entstehende Fibrin lagert sich dann zu einem Polymer zusammen. Nach Abschluss der Polymerisation kann die gegossene Struktur, hier eine Herzklappe, vorsichtig aus der Gussform ausgelöst werden, muss allerdings vor Implantation

4 Optimierung des Tissue Engineerings von Herzklappen auf Fibringelbasis

in einem Bioreaktorsystem kultiviert werden, da die mechanische Stabilität des Gels für eine direkte Implantation zu gering ist.

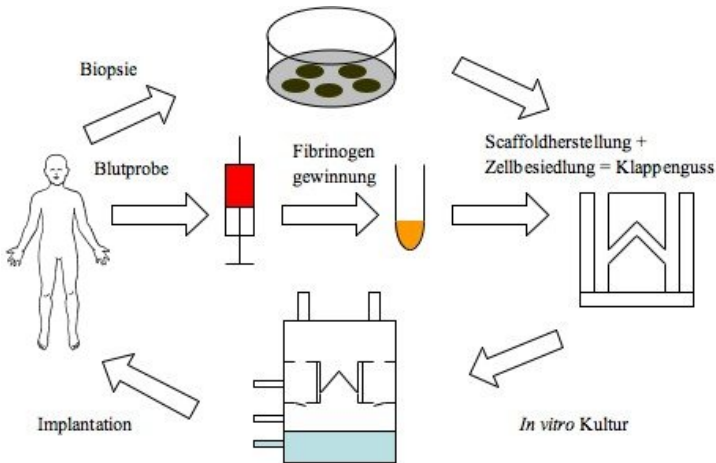


Abbildung 4.1: Fibringel als Scaffold des Valvulären Tissue Engineerings

Die Möglichkeit, Fibringel als Scaffold für cardiovasculäres Tissue Engineering zu nutzen, wurde von Ye et al. [105] aufgezeigt, indem sie Myofibroblasten in Fibringel unter statischen Bedingungen kultivierten und die Gewebeerwicklung über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen beurteilt wurde. Insbesondere die Verwendung des Proteaseinhibitors Aprotinin, der den Abbau des Fibringels durch die Inhibition des lysierenden Enzyms Plasmin verhindert, ermöglichte das Entstehen dreidimensionaler Zell-Matrix-Verbände. Ohne Aprotinin wird das Fibringel innerhalb von 2 Tagen durch die eingegossenen Zellen sowie die Enzyme, die fetales Kälberserum als Zellkulturzusatz enthält, abgebaut; das Resultat ist ein Monolayer am Boden des Zellkulturgefäßes. Durch Zugabe von 130 KIU Aprotinin pro Milliliter Kulturmedium kann der Abbau des Fibringels komplett verhindert werden. Dies resultierte in der besten Gewebeerwicklung. Jockenhoevel et al. [44] führen dies

60

auf erschwertes Auswaschen der produzierten extrazellulären Matrixproteine aus der Fibringelmatrix zurück.

Werden Zellen in Fibringel, wie oben angegeben, unter statischen Bedingungen kultiviert, schrumpft das sich entwickelnde Gewebe auf etwa 30 % seines Ausgangsvolumens [44]. Dieser Prozess tritt nur auf, wenn Zellen in das Gel eingegossen werden. Er kann also auf den Umbau des sich entwickelnden Gewebes durch die eingegossenen Zellen, insbesondere die Produktion extrazellulärer Matrixproteine, allen voran Kollagen, zurückgeführt werden. Neu zusammengelagerte Kollagenfasern zeigen von sich aus schon die Tendenz zu schrumpfen, die durch die Zugabe von Fibrin noch verstärkt wird [17].

Die mechanische Stabilität der Matrices wird durch die Schrumpfung zwar verbessert, vor dem Hintergrund der komplexen dreidimensionalen Struktur einer Herzklappe muss aber das Verhindern der Schrumpfung ein Ziel sein. Aus dieser Überlegung haben Jockenhövel et al. [44] die Gewebeentwicklung in Fibringelen, die durch unterschiedliche Methoden fixiert wurden, untersucht. Insbesondere eine randständige Fixierung der Gele konnte unter statischen Kulturbedingungen die Schrumpfung verhindern und führte gleichzeitig zu einer erhöhten Produktion extrazellulärer Matrixproteine, insbesondere von Kollagen.

Komplexe dreidimensionale Strukturen durch Spritzguss leicht erzeugen zu können, ist einer der wesentlichen Vorteile von Fibringel als Scaffoldmaterial. Jockenhövel et al. haben Verfahren sowohl für den Guss von kleinkalibrigen Gefäßprothesen [41] als auch für den Guss von Semilunarklappen mitsamt zugehörigem Gefäßstamm [42] beschrieben. Diese sind leichter anzuwenden als die bereits dargestellten Verfahren zur Erzeugung dreidimensionaler Strukturen aus textilen Geweben (vgl. Kapitel 3.4.2.2), auch wenn die exakte Nachbildung der Klappenwurzel mit den Sinus Valsalvae noch aussteht.

Die Kultur der erzeugten Strukturen ist nur dann möglich, wenn die me-

4 Optimierung des Tissue Engineerings von Herzklappen auf Fibringelbasis

mechanische Stabilität direkt nach Guss nicht zu gering ist. Hierzu gibt es unterschiedliche Strategien: Zum einen wird versucht, die Zusammensetzung von Fibringelen im Hinblick auf erhöhte Stabilität zu erhöhen [67]. Hierbei steht insbesondere eine Erhöhung der Fibrinogenkonzentration und die Beimischung von Faktor XIII im Vordergrund. Aber auch durch die Verwendung von textilen Geweben kann die Stabilität erhöht werden. Dabei gibt es den Ansatz, das Gel durch Eingießen eines textilen Gewebes zu stabilisieren [41] oder aber Fibringel zu nutzen, um die Besiedlung textiler Scaffolds mit Zellen zu verbessern [64].

Auf diesen beiden Verfahren beruhen die wesentlichen Versuche, Fibringel im Rahmen des kardiovaskulären Tissue Engineerings bei der Erzeugung kleinkalibriger, autologer Gefäßprothesen zur Anwendung zu bringen. Nach Kultur unter definierten Scherstressbedingungen, die durch ein Bioreaktorsystem erzeugt wurden, konnte bei beiden Ansätzen gute Gewebeentwicklung über Zeiträume von sechs Wochen nachgewiesen werden.

Kulturversuche valvulärer Strukturen auf Fibringelbasis wurden bisher nicht unternommen. Im Folgenden soll die Weiterentwicklung des von Jockenhövel et al. beschriebenen Gussverfahrens dargestellt und eine Möglichkeit aufgezeigt werden, die gegossene Struktur in einem Bioreaktorsystem unter dynamischen Bedingungen zu kultivieren.

4.1 Weiterentwicklung des Gußprozesses

4.1.1 Zielsetzungen

Die Verwendung von Fibringel als Scaffoldmaterial birgt, wie oben beschrieben, einige Besonderheiten und Herausforderungen in sich. Einerseits können komplexe dreidimensionale Strukturen wie die einer Herzklappe mit Hilfe eines Spritzgussverfahrens relativ einfach erzeugt

werden. Andererseits macht die geringe mechanische Stabilität den Umgang mit den gegossenen Strukturen sehr schwierig. Außerdem verändert der im Laufe der Kultur auftretende Schrumpfungprozess die Form des entstehenden Gewebes. Hieraus ergeben sich für diese Arbeit die Zielvorgaben für die Weiterentwicklung des Gussverfahrens auf Fibringelbasis:

1. Die Geometrie der Gussform muss den insbesondere durch Schrumpfung auftretenden Veränderungen des sich entwickelnden Gewebes angepasst werden.
2. Ein schonender Umgang mit der gegossenen Herzklappe soll insbesondere beim Einbau in das Bioreaktorsystem ermöglicht werden.

4.1.2 Prototyp des Gussverfahrens

Das zunächst verwendete Gussverfahren wurde von Jockenhoevel et al. [42] beschrieben: Es basiert auf zwei mittels Rapid Prototyping aus Epoxidharz geformten Gussstempeln, die bis auf die *Sinus Valsalvae* einem Negativ des rechtsventrikulären Ausflußtraktes und der Pulmonaliswurzel entsprechen. Umhüllt und in Position gehalten werden diese durch einen aus Aluminium gefertigten Mantel. Der Boden mitsamt Gussstempel für den rechtsventrikulären Ausflusstrakt und die Seitenwände werden zunächst zusammengebaut, das Fibringel eingegossen und der Deckel mitsamt pulmonalem Gussstempel eingesetzt. Nach Abschluss der Polymerisation kann die Klappe vorsichtig aus der Form ausgelöst und die einzelnen Segel mit einem Skalpell voneinander getrennt werden.

Dieses Gussverfahren macht den Einbau der gegossenen Klappe in ein Bioreaktorsystem sehr schwierig: Eine Klappe ist direkt nach Guss zwar

4 Optimierung des Tissue Engineerings von Herzklappen auf Fibringelbasis

grundsätzlich nahtfähig; diese Naht hält den Belastungen in einem Bio-reaktorsystem aber nicht stand. Daneben führt die Schrumpfung insbesondere der Klappensegel zu einer unphysiologischen Form und zur Insuffizienz der Klappe.

4.1.3 Weiterentwicklung der Gusskammer

Um diesen Aspekten Rechnung zu tragen, wurde das oben beschriebene Verfahren, bei dem sich in einer Gußform die negativen Abdrücke des ventrikulären Ausflußtraktes und der Gefäßwurzel gegenüberstehen, in einigen Punkten modifiziert (siehe Abbildung 4.2).



Abbildung 4.2: Gussform Version II (ohne Silikonmantel)

Als Außenwandung des Gefäßes dient nicht mehr die Gußform selbst, sondern ein Silikonconduit. Silikon, ein Polymer aus Silizium und Sauerstoff mit organischen Seitengruppen, ist gut geeignet als Material im Bereich des Tissue Engineerings [15]:

Es ist weich und weist eine hohe Stabilität bei niedriger Toxizität auf; diese beiden Eigenschaften haben zu seiner Verbreitung als Implantatmaterial geführt. Daneben weist es aber auch eine hohe Gasdurchläss-

sigkeit auf und kann mittels Spritzgußverfahren leicht verarbeitet werden. Dabei weisen Silikone, deren Aushärtung auf Platinkatalisatoren beruht, die günstigsten Eigenschaften für die präzise Herstellung von Strukturen durch Gußverfahren auf: es verformt sich nach seiner Vulkanisation, die je nach Produkt auch bei Raumtemperatur erfolgen kann, nicht mehr und es entstehen keinerlei Abbauprodukte. Außerdem weisen platinvulkanisierte Silikone die höchste Gasdurchlässigkeit auf.

Für das Conduit kommt entsprechend ein Silikon mit Platin als Vulkanisierungskatalysator zur Anwendung. Das Gefäßstück wird komplett in dieses Conduit eingegossen, welches wie die Fibringelstruktur eine Länge von 28 mm hat. Der Innendurchmesser des Conduits entspricht mit 22 mm dem Aussendurchmesser der Gelstruktur; die nötige Formstabilität wird durch eine Wandstärke von 2 mm sichergestellt.

Das Conduit und die Klappe werden in der gleichen Gußkammer unter Verwendung unterschiedlicher Gußstempel hergestellt, wobei für das Silikonconduit ein Zylinder als Negativ dient. Da das Fibringel nach Abschluss der Polymerisation am Silikonconduit haftet, behält das Gel auch nach Öffnen der Gußform und Entfernen der Gussstempel genug Stabilität, um es leicht zu handhaben. Die Haftung des Gels am Silikon wirkt außerdem als Gegenkraft der Schrumpfungstendenz des Fibringels entgegen. Diese Version der Gusskammer wurde aus POM gefertigt.

Da bei vielen Versuchsläufen nicht nur eine Schrumpfung der Klappensegel einsetzte, sondern sich die gesamte Pulmonalwurzel vom Silikonconduit ablöste und in sich zusammenschrumpfte, wurde eine neue Befestigungsmöglichkeit für das Fibringel am Silikonring entwickelt.

Das Fibringel wurde in einem ersten Versuch proximal und distal mittels Einzelknopfnähten fixiert; alternativ wurden schmale Ringe aus Dacron beziehungsweise einer grobmaschigen PVDF-Textilstruktur am proximalen und distalen Ende des Gels eingegossen und diese Ringe

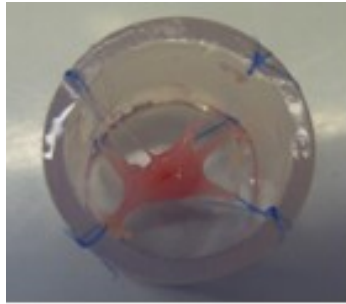
4 Optimierung des Tissue Engineerings von Herzklappen auf Fibringelbasis

am Conduit fixiert (siehe Abbildung 4.3). Diese Befestigungsmöglichkeiten wurden gegeneinander evaluiert.

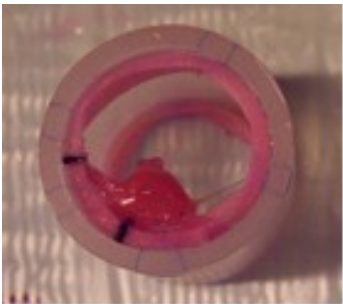
Sowohl Einzelknopfnähte als auch Dacronstreifen boten keine ausreichende Kontaktoberfläche für die Befestigung des Fibringels, das sich trotz ausreichender initialer Befestigung retrahierte. Dagegen konnte durch eine grobmaschiges PVDF-Textilstruktur (Institut für Textiltechnik der RWTH Aachen) mit höherer Kontaktoberfläche eine ausreichende Befestigung des Gels am Silikon erreicht und hierdurch dem Schrumpfungsprozess entgegengewirkt werden.



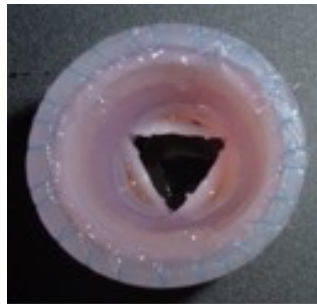
(a) Klappe vor Kultur



(b) Einzelknopfnähte



(c) Dacronprothese



(d) PVDF-Textilstruktur

Abbildung 4.3: Weiterentwicklung der Klappenaufhängung

4.1.4 Weiterentwicklung der Gussstempel

Die Gußstempel stellen vereinfachte Negative des Gefäßstammes und des ventrikulären Ausflußtraktes ohne Berücksichtigung der Ausbuchtung der Sinus Valsalvae dar. Die zunächst verwendeten Stempel entsprechen ansonsten der nativen Geometrie einer Semilunarklappe, wobei die Trennung der Segel voneinander nach Guß mit Hilfe eines Skalpells manuell erfolgen mußte. Die Stempel wurden mittels Rapid Prototyping aus Epoxidharz hergestellt. Um der Schrumpfungstendenz insbesondere der Klappensegel entgegenzuwirken, wurden die Gussstempel in mehreren Schritten modifiziert (vgl. Abbildungen 4.4 und 4.5). Anstatt wie bei Version I die Geometrie der nativen Klappe nachzubilden, wurde bei Version II die Oberfläche der Segel durch Verlängern der Kommissuren um 20 % gegenüber den ersten Gussstempeln vergrößert, um so dem Schrumpfungsprozeß des Gewebes entgegenzuwirken. Weiterhin mußten allerdings die Segel von Hand mit Hilfe eines Skalpells voneinander getrennt werden.

In einem weiteren Modifikationsschritt mußte erneut die Geometrie der Gussstempel überdacht werden, da zwar durch die erhöhte Klappenoberfläche in Kombination mit der oben beschriebenen besseren Aufhängung die Verkleinerung des Gefäßstammes unterbunden werden konnte, sich die Klappensegel jedoch weiterhin bis zur Insuffizienz verkleinerten. Dabei schien insbesondere die Koaptationsregion einer starken Schrumpfung zu unterliegen, so dass nun Höhe und Länge der Kontaktfläche beim Klappenschluss (Koaptation) vergrößert wurden. Dazu wurden die Segel über die Kommissuren hinaus bogenförmig verlängert, um so einerseits eine möglichst große Fläche zu erzeugen, auf der sich die Segel aneinander legen können, andererseits aber auch die Länge des freien Segelrandes zu erhöhen. Im gleichen Modifikationsschritt wurde eine 1 mm starke Trennwand zwischen die Segel gesetzt, um Beschädigungen beim Trennen der Kommissuren zu unterbinden. Bei

4 Optimierung des Tissue Engineerings von Herzklappen auf Fibringelbasis

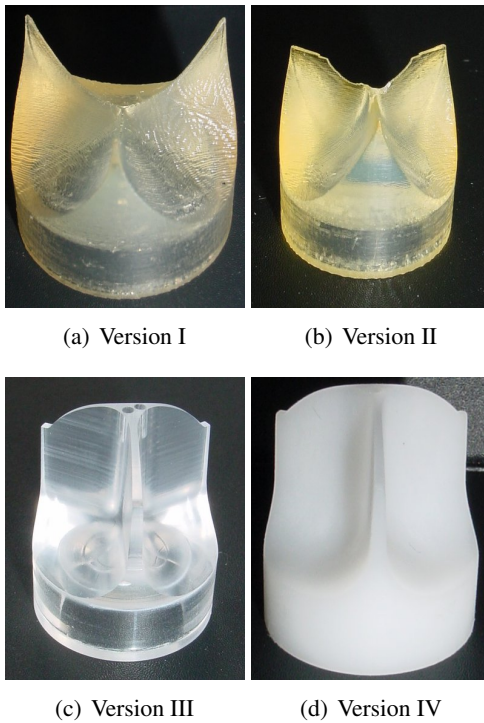


Abbildung 4.4: Modifikationsschritte des aortalen Gussstempels

4.1 Weiterentwicklung des Gußprozesses

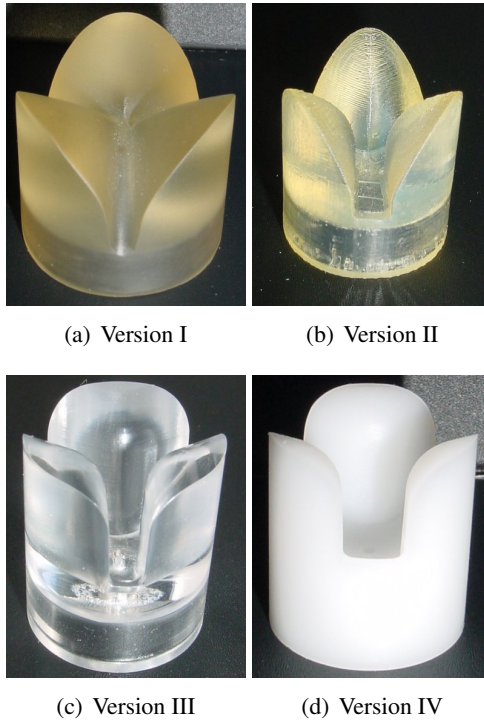


Abbildung 4.5: Modifikationsschritte des pulmonalen Stempels

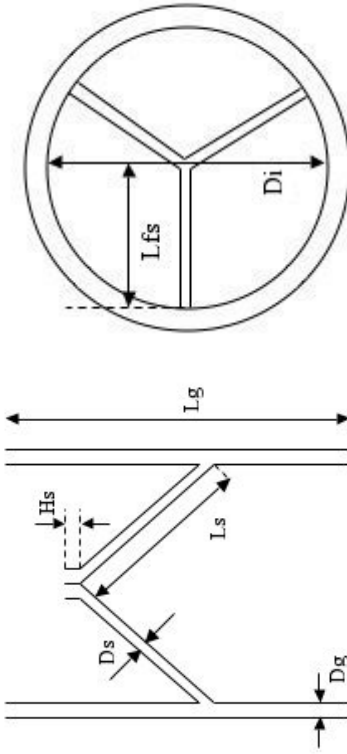
4 Optimierung des Tissue Engineerings von Herzklappen auf Fibringelbasis

Vorversuchen zum Gussverhalten und zur Stabilität zeigte sich jedoch, dass die stark verlängerten Segel zu fragil sind, um die Klappe ohne Beschädigung aus der Gussform auszulösen und sie in einem Bioreaktorsystem zu kultivieren. Deshalb wurde zusätzlich die Spaltbreite zwischen den Stempeln und damit die Dicke der Klappensegel vor Kultur auf 2 mm erhöht. Eine genaue Beschreibung der durch die verschiedenen Gußstempel erzeugten Geometrien erfolgt in Abbildung 4.6.

Im Zuge dieser Modifikationen wurde das Material der Gussstempel zunächst auf PMMA umgestellt, um Problemen bei der Biokompatibilität von Epoxidharz auszuweichen und eine Fertigung in der hauseigenen Werkstatt zu ermöglichen. Fibringel haftet jedoch recht gut an PMMA, so dass für den zweiten Schritt der hier beschriebenen Modifikationen Polyoxymethylen (POM) als Material eingesetzt wurde [71]. Hohe Stabilität und Biokompatibilität machen POM zu einem beliebten Implantatmaterial; es ist leichter zu verarbeiten und nutzt sich langsamer als PMMA ab. Dieses Material kann nicht durchsichtig hergestellt werden, erfüllt jedoch gut die an eine Gußform gestellten Anforderungen.

4.2 Endothelzellbesiedlung

Um eine physiologische Klappenoberfläche erzeugen zu können, ist eine Besiedlung der Klappe mit Endothelzellen notwendig. Dies stellt seit den ersten Versuchen, mechanische Klappenprothesen mit Endothelzellen zu beschichten (vgl. 3.3) einen Grundsatz des cardiovascularen Tissue Engineerings dar. Die erfolgreiche Beschichtung einer Gefäßprothese ist dabei aufgrund ihrer einfachen Form oft gezeigt worden. Dem gegenüber stellt die komplexe Geometrie einer Herzklappe eine größere Herausforderung dar, wobei die größten Erfolge mit Beschichtungssystemen erzielt wurden, die eine Bewegung in wenigstens zwei Raumrichtungen ermöglichen [30].



(a) Gegossene Klappe - Schnitt (b) Gegossene Klappe - Aufsicht

Version	I	II	III	IV
Innendurchmesser D_i	24 mm	17 mm	17 mm	17 mm
Gefäßwandstärke D_g	2,5 mm	2,5 mm	2,5 mm	2,5 mm
Länge des Gefäßes L_g	30 mm	28 mm	28 mm	28 mm
Länge der Segel L_s	15 mm	12 mm	14,5 mm	13,5 mm
Höhe der Koaptation H_s	1 mm	1 mm	3,5 mm	2,5 mm
Länge des freien Segelrandes L_{fs}	34 mm	17 mm	22 mm	20 mm
Dicke der Segel D_s	1 mm	1 mm	1 mm	2 mm

Abbildung 4.6: Tabellarische Übersicht über die Geometrie einer gegossenen Klappe mit erklärender Schemazeichnung.

4 Optimierung des Tissue Engineerings von Herzklappen auf Fibringelbasis

Lüders et al. haben für diesen Zweck ein Verfahren entwickelt, mit dem es möglich ist, das zu besiedelnde Gewebe in allen drei Raumrichtungen zu bewegen [57]. Dazu wird eine Besiedlungskammer, die die zu besiedelnde Herzklappe enthält, in eine Kugel aus PMMA eingespannt. Diese kann, frei gelagert, durch einen elektrischen Antrieb in allen Richtungen rotiert werden. Aufgrund des abgeschlossenen Raumes stellt der Gasaustausch hier eine Limitation dar.

Mit diesem aufwendigen Verfahren als Vorbild wurde ein dynamisches Zellbesiedlungsverfahren für Endothelzellen entwickelt. Dieses basiert auf einer sterilen Kammer, die auf einer Rollerpumpe (Ismatec, MCP-Process IP-65) montiert werden kann und so eine Bewegung zunächst in einer Raumrichtung durch die Drehung der Pumpe ermöglicht. Die Befestigungsvorrichtung ist zusätzlich um 30° gegenüber der vertikalen Ebene verkippt (vgl. Abbildung 4.7) und stellt so die Bewegung in einer weiteren Raumrichtung sicher.

Die Kammer besteht aus einem Becher, der über ein Gewinde mit einem Deckel dicht verschlossen werden kann. Da der Silikonmantel der gegossenen Klappe sich nicht gut gegenüber dem aus POM gefertigten Becher verschieben lässt, wird dieser zwischen zwei Spangen aus dem gleichen Material eingefaßt, die sich dann leicht mitsamt der Klappe im Silikonmantel in den Becher hineinschieben lassen. Über zwei Anschlüsse im Deckel lässt sich das System mit Endothelzellsuspension füllen und entlüften, wobei das geringe Füllvolumen von 5 Millilitern eine hohe Konzentration von Endothelzellen an der Klappenoberfläche sicherstellt.

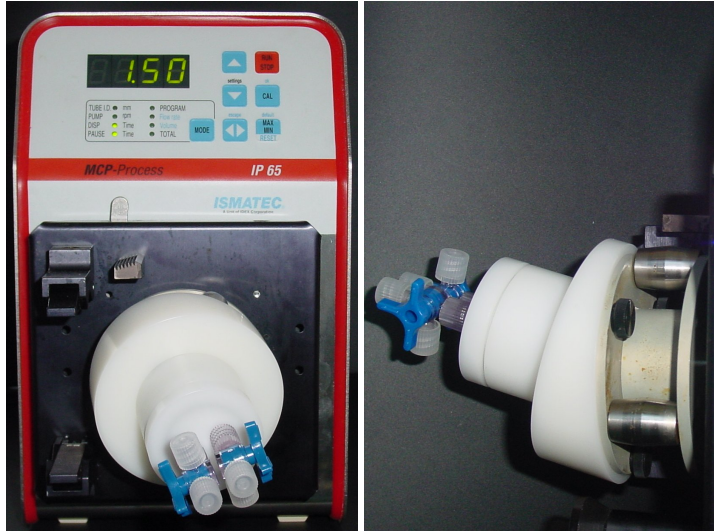


Abbildung 4.7: Besiedlungskammer, montiert auf der Rollerpumpe. Die Abbildung läßt die Verkippung der Besiedlungskammer um 30° gegenüber der vertikalen Ebene erkennen, die eine Bewegung in zwei Raumrichtungen zusätzlich zur Drehachse ermöglicht.



Abbildung 4.8: Bestandteile der Endothelzellbeschichtungskammer

4.3 Bioreaktorentwicklung

4.3.1 Zielsetzungen

Für die *In-Vitro*-Kultur einer tissue-engineerten Herzklappe auf Fibrinigelbasis wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Bioreaktorsystem entwickelt. Unter der Vorstellung, bei der Kultur der Klappe von fetalen Kreislaufverhältnissen mit zunächst niedriger Frequenz und Schlagvolumen ohne Druckdifferenz über die Klappe auszugehen und die Belastungen auf die Klappe langsam steigern zu wollen, wurden folgende Zielsetzungen für den zu entwickelnden Bioreaktor definiert:

- Variable Frequenz und Schlagvolumen
- Keine diastolische Last auf den Klappensegeln
- Anpassbare Windkesselfunktion
- Von Frequenz und Schlagvolumen unabhängiger Gasaustausch
- Transparenz des Kulturprozesses
- Schonender Transfer der Klappe in das Reaktorsystem
- Einfache Handhabung.

4.3.2 Bioreaktor Version I

Ausgehend vom Prinzip des von Hoerstrup beschriebenen Pulsduplikators [36] wurde ein Bioreaktor entwickelt, der die in 4.3.1 dargestellten Funktionen in einem Bauteil zur Verfügung stellen kann.

Das System (vgl. Abbildung 4.9) läßt sich in vier funktionelle Einheiten unterteilen. Die Pumpfunktion wird von Kammer 1 und 2 bereitgestellt, die durch eine pneumatisch auslenkbare Membran voneinander abgetrennt sind. Kammer 2 bildet den Ventrikel nach. Ihre Größe

ist limitierend für die Auslenkung der Membran und bedingt so ein maximales Schlagvolumen von 25 ml. Zur pneumatischen Auslenkung der Membran wird ein Siemens Servo 900B / C Respirator (Siemens, Deutschland) verwendet, der Beatmungsfrequenzen von 5 bis 60 Hüben pro Minute gestattet.

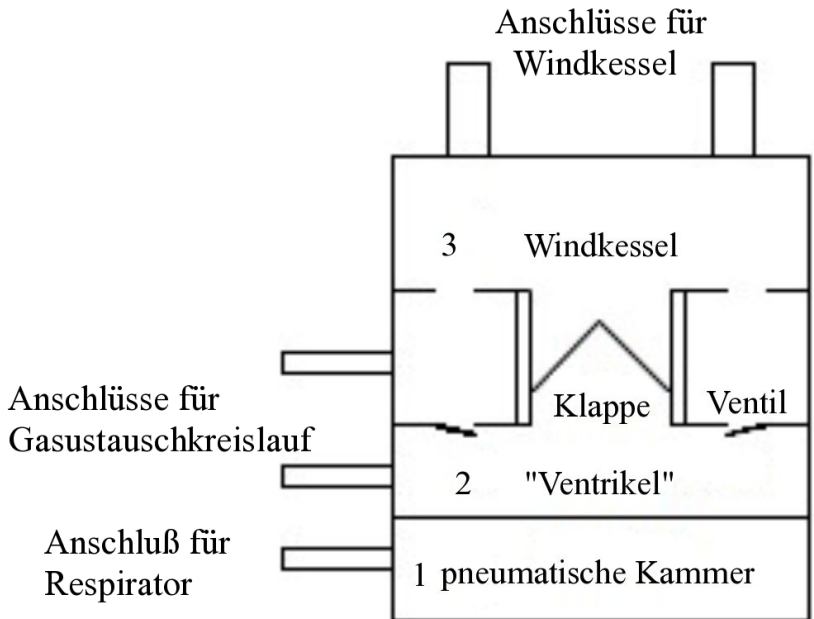


Abbildung 4.9: Bioreaktor Version I

Die Kulturkammer wird von der gegossenen Klappe mitsamt ihres Silikonmantels gebildet. Die Klappe wird zwischen zwei Trennböden in Vertiefungen so festgehalten, dass sie eine Verbindung zwischen Kammer 2 und 3 herstellt. Die äußeren Anteile von Kammer 3 stehen über

4 Optimierung des Tissue Engineerings von Herzklappen auf Fibringelbasis

Bohrungen mit Kammer 2 in Verbindung, wobei Silikonlippen als Rückschlagventile fungieren, um einen gerichteten Fluß über die Klappe zu gewährleisten. Während der Systole wird die Kammer 1 mit Luft gefüllt. Durch Dehnung der Membran wird Kulturmedium aus Kammer 2 über die Klappe in Kammer 4 verdrängt. Gleichzeitig schließen die Ventile zwischen Kammer 2 und 3. Wenn der Druck in Kammer 1 gesenkt wird, kann das Kulturmedium passiv über die äußeren Anteile von Kammer 3 zurückfließen, während der Rückfluß über die Klappe von dieser selbst verhindert wird.

Kammer 3 stellt die Windkesselfunktion zur Verfügung. Da sie Anschlüsse für beliebige sterile Reservoirs oder auch Gasfilter aufweist, können Größe und Compliance des Windkessels in weiten Grenzen verändert werden.

Ein gesondertes Reservoir wird bei diesem Reaktorkonzept nicht benötigt, da ein Füllvolumen von 250 ml inklusive des noch zu beschreibenden Schlauchsystems als ausreichend für die Versorgung mit Nährstoffen erachtet wurde. Der Gasaustausch zwischen Bioreaktor und der Luft im Inkubator wird durch einen externen Gasaustauschkreislauf sichergestellt, um ihn unabhängig vom Fluss über die Klappe kontrollieren zu können. Dieser besteht aus einem platinvernetzten Silikon-schlauch (ISMATEC Tygon SI RSC0584, FDA-Zulassung für die Herstellung von Pharmaka, Nummer 21CFR 177.2600) mit hohen Gaspermeabilitätskoeffizienten für Sauerstoff, Kohlendioxyd und Stickstoff und setzt an Kammer 2 und 3 an. Über eine Rollerpumpe (ISMATEC MCP-Process IP-65) wird das Kulturmedium von Kammer 2 in Kammer 3 gepumpt.

Das Bioreaktorsystem besteht, abgesehen von den Schläuchen des externen Gasaustauschkreislaufes, komplett aus Polymethylmethacrylat (PMMA, Plexiglas, ThyssenKrupp Schulte GmbH). Polymethylmethacrylat ist wie Silikon ein Polymer mit günstigen Eigenschaften für das

Tissue Engineering [16]: Es ist stabil, weist eine hohe Biokompatibilität auf und ist weit verbreitetes Implantatmaterial. Im Gegensatz zu Silikon ist es spröde und aufgrund dessen sowohl schwieriger zu verarbeiten als auch anfälliger für Risse. Günstig für viele Anwendungen ist seine gläßstimmung der optimalen Stimulationsfrequenz durchgeführt (vgl. Kapitel 6.2). Dabei wurden die Klappen einem Frequenzspektrum von 5 bis 15 Schlägen pro Minute über einen Zeitraum von 3 bis 30 Tagen ausgesetzt. Das Schlagvolumen wurde im Hinblick auf in der Literatur beschriebene Vorteile geringer Scherkräfte [5] zu Beginn der Kultur von tissue-engineerten Geweben in Bioreaktoren auf 15 Milliliter festgelegt. In die Klappen wurden 15 Millionen Myofibroblasten bei einem Gussvolumen von 6 Millilitern, also 2,5 Millionen Zellen pro Milliliter, eingegossen.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden Zellkonzentrationen von 2,5, 5 und 10 Millionen Zellen pro Milliliter Gel evaluiert (vgl. Kapitel 6.3).

4.3.3 Bioreaktor Version II

Unter der Vorstellung, zunächst fetale Bedingungen für die Entwicklung der Klappe zur Verfügung stellen zu wollen, weist das erste Konzept des Bioreaktors keine Möglichkeit auf, die Segel der Klappe in der Diastole einer definierten Last auszusetzen, beziehungsweise eine Druckdifferenz über die Klappe herzustellen. Zwar kann der auf

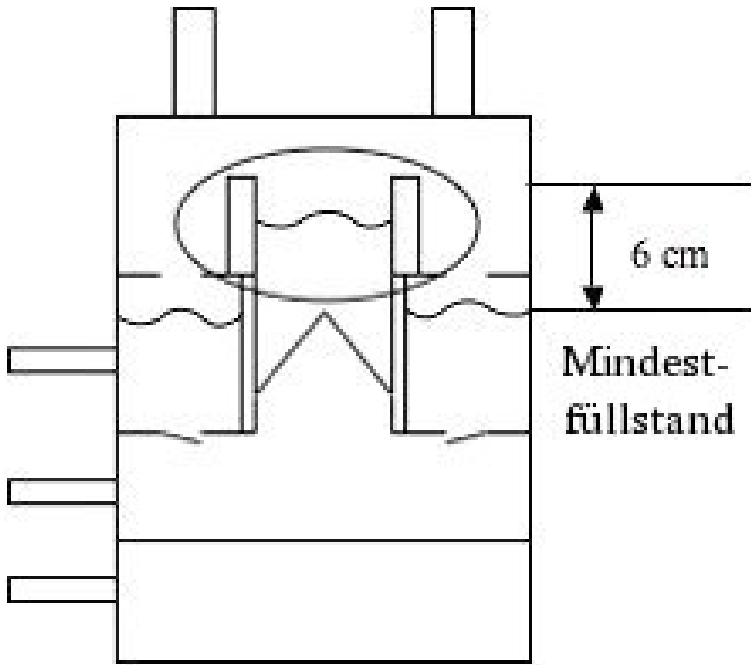


Abbildung 4.10: Bioreaktor Version II

die Klappe insgesamt einwirkende hydrostatische Druck durch Ändern der Füllhöhe in Kammer 3 verändert werden, aber im Laufe der Versuche erschien auch eine variabel einzustellende Druckdifferenz über die Klappe sinnvoll, um einer auftretenden Schrumpfungstendenz des sich entwickelnden Gewebes entgegenwirken zu können. Um diese zu erzeugen, wird der Reaktor geringfügig modifiziert (vgl. Abbildung 78

4.10): in Verlängerung der Kulturkammer wird in Kammer 3 eine Röhre angebracht, über deren Füllhöhe in dieser Ausführung des Reaktors eine Druckdifferenz von bis zu 6 cmH₂O über die Klappe erzeugt werden kann, ohne dass die Klappe auf der ventrikulären Seite trocken läuft. Durch Variation des Füllstandes in Kammer 3 kann die diastolische Last auf die Klappensegel also geändert werden.

In einer systematischen Versuchsreihe wurde der Einfluß einer diastolischen Last von 2 cm H₂O auf die Gewebeentwicklung evaluiert.

4 Optimierung des Tissue Engineerings von Herzklappen auf Fibringelbasis

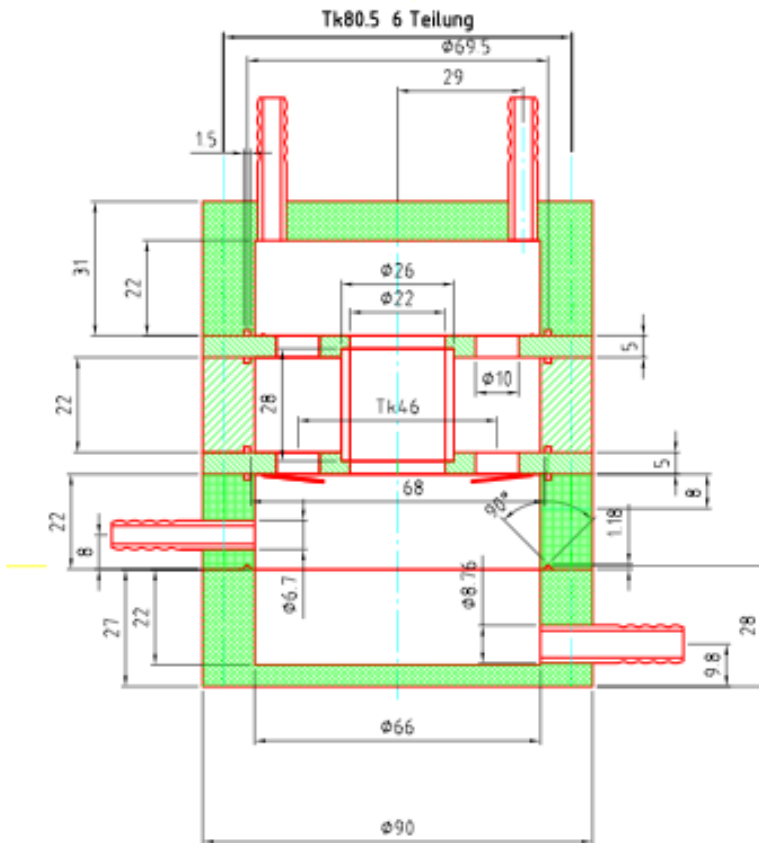


Abbildung 4.11: Technische Zeichnung des Bioreaktors. Version I.

5 Material und Methoden

Für die Herstellung einer tissue-engineerten Klappe wurden entsprechend dem in Kapitel 3.1 dargestellten Prinzipien zunächst Zellkulturen von Myofibroblasten angelegt, die Zellen amplifiziert und anschließend mit Hilfe des Scaffoldmaterials Fibrinogen eine Herzklappe gegossen. Die Gewebeentwicklung in dieser Art hergestellter Klappen wurde unter verschiedenen Bedingungen im vorgestellten Bioreaktorsystem evaluiert.

Im Weiteren folgt nun eine genaue Beschreibung der verwendeten Verfahren, die die Herstellungsschritte Zellkultur, Klappenguß und Kultur unter Rückgriff auf Kapitel 4 nachvollzieht. Anschließend werden die zur Beurteilung der Gewebeentwicklung genutzten Verfahren dargestellt.

5.1 Anlage der Primärkulturen

Der erste Schritt des Tissue Engineerings einer Herzklappe ist die Gewinnung einer geeigneten Zellquelle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die benötigten glatten Muskelzellen aus Schafskarotiden gewonnen, deren Entnahme unter sterilen Bedingungen erfolgte. Nach der Entnahme konnten die Gefäßstücke bis zu 24h in folgendem Transportmedium bis zur Verarbeitung steril aufbewahrt werden:

- 8,00 g/l NaCl (Sigma S-9625)

5 Material und Methoden

- 0,30 g/l KCl (Merck 1.04936.0500)
- 2,38 g/l Hepes Sodium Salt (Sigma H-3784)
- 2 g/l Glucose (Merck 1.08337.0250)
- 10 ml/l antibiotisch-antimykotische Lösung (Gibco, 15240-062)
- in Aqua dest. lösen
- pH auf 7,5 einstellen
- Verwendung gekühlt bei 4°C

Es wurden Schafszellen verwendet, weil das Schaf ein akzeptiertes Standardversuchstier für die Erprobung cardiovasculärer Implantate darstellt [3]. Die Auswahl von Karotiden als Biopsiequelle erfolgte aufgrund der einfachen Explantierbarkeit.

Unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank Heraeus HERAsafe) wurden die Gefäßstücke zunächst grob mit in Phosphate Buffered Saline (PAA H15-002) getränkten sterilen *Mullkompressen* (Maimed 25070) gereinigt und anschließend mit sterilem chirurgischen Besteck die Adventitia entfernt. Blutreste wurden, soweit möglich, entfernt.

Nun erfolgte die Entfernung der Endothelzellen von der Innenseite des Gefäßes. Zunächst wurde das Gefäßstück an jedem Ende mit Hilfe von *Knopfkanülen* (WDT 07512) kanüliert, mit *Nabelschnurklemmen* (Sarstedt MPL 74.4701) befestigt und dann mit 2 x 20 ml *Phosphate Buffered Saline* durchgespült. Jetzt wurden, je nach Länge des Gefäßstückes, 3-5 ml *Kollagenaselösung*, bestehend aus

- 1 mg/ml Kollagenase Typ IA (Sigma C2674)
- in Aqua dest.

- Verwendung vorgewärmt bei 37°C

eingefüllt und dort für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach der Inkubation wurden die Endothelzellen mit 2 x 20 ml *Zellkulturmedium* (DMEM low glucose, Gibco 21885-025, mit 10 % fötalem Kälberserum, Gibco 10270-160 und 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung, Gibco 15240-062) aus dem Gefäßstück herausgespült und die Zellen bei 500 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 8 ml *Kulturmedium* resuspendiert und die Zellen in eine zuvor mit Gelatine beschichtete *Kulturflasche* (T 75, Falcon 353136) überführt. Für die Beschichtung wurden 5 ml einer 1%-*Gelatinelösung* mit folgender Zusammensetzung:

- Kaisers Glyceringelatine (Merck, 1.09242.0100)
- 1% in Aqua dest. lösen
- Autoklavieren bei 121°C für 15 Minuten
- Verwendung bei Raumtemperatur

in eine T 75 *Kulturflasche* gefüllt und diese direkt im Anschluss wieder abgesaugt. Diese Flasche wurde vor Verwendung eine halbe Stunde bei 37°C getrocknet.

Für die Gewinnung von Myofibroblasten wurden die Gefäßstücke auf einer sterilen *Petrischale* (Sarstedt 83.1802), gefüllt mit *Phosphate Buffered Saline*, in etwa 1 mm lange Ringe zerkleinert. Mit Hilfe einer *serologischen Pipette* (Falcon 357543) konnten die Stücke in eine T 75 *Kulturflasche* überführt werden. Dort werden sie mit einer *Pasteurpipette* (Brand 747720) vereinzelt, die *Phosphate Buffered Saline* abgesaugt und 3 ml des oben beschriebenen *Zellkulturmediums* hinzugefügt. Über Nacht adherierten die Stücke an der Kulturflasche, so dass am

nächsten Tag das Kulturmedium auf 6 ml ergänzt werden konnte. Nach einer Woche konnte mit Mediumwechseln begonnen werden, die pro Woche zweimal durchgeführt werden sollten. Nach weiteren zwei bis drei Wochen wurden die Gefäßstücke entfernt. Bei konfluentem Zellrasen wurden die Kulturen passagiert.

Die Kultur der Zellen erfolgte in einem *CO₂-Inkubator* (Sanyo MCO 17-AIC) bei 37°C und 5% CO₂.

5.2 Amplifikationskultur

Die wie beschrieben angelegten Primärkulturen wurden bei konfluentem Zellrasen passagiert. Dazu wurde zunächst das *Kulturmedium* abgesaugt, die Zellen mit 8 ml *Phosphate Buffered Saline* gespült und 5 ml *Trypsin / EDTA Lösung* (Trypsin 0,5g/l mit EDTA 0,2g/l, PAA L11-004) auf die Zellen gegeben. Nach etwa 5 Minuten lösten sich die Zellen vom Kulturgefäß. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurden nun 10 ml *Zellkulturmedium mit 10 % fötalem Kälberserum* hinzugefügt und die Zellen anschließend bei 500 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das abgesetzte Pellet wird schließlich in 24 ml des *Kulturmediums* resuspendiert und diese Menge auf drei *T 75 Kulturflaschen* aufgeteilt.

Mediumwechsel erfolgten auch in Amplifikationskultur 2-mal pro Woche. Die weiteren Passagen werden jeweils bei konfluentem Zellrasen wie beschrieben durchgeführt. Unterschiede bei der Kultur von Endothelzellen und Myofibroblasten ergaben sich lediglich in der Verwendung von gelatinebeschichteten Kulturflaschen für Endothelzellen.

Alle beschriebenen Versuche wurden mit Zellen aus Passage 4 durchgeführt. Um optimale Resultate bei der Polymerisation des Fibringels zu erzielen, wurde eine modifizierte Form des Passagierens direkt vor dem Fibringelguß eingesetzt. Zunächst wurden die Zellen zwar mit 8

ml *Phosphate Buffered Saline* gespült, aber dann nur 2,5 ml *Trypsin / EDTA Lösung* auf die Zellen gegeben. Nach genau 5 Minuten wird das Trypsin mit 12,5 ml *Zellkulturmedium mit 10 % fötalem Kälberserum* inaktiviert und die Zellen danach bei 500 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Schließlich erfolgte die Resuspension im für den jeweiligen Versuch erforderlichen Medium.

5.3 Fibringelherstellung

Die nach Kapitel 5.2 vorbereiteten Zellen wurden zur Formgebung in einen Scaffold aus Fibringel eingegossen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde größtenteils industriell isoliertes Humanfibrinogen und nur vereinzelt zu Testzwecken aus Schafsblut isoliertes Fibrinogen eingesetzt. Da die Nutzung eines autologen Scaffolds Ziel der Nutzung von Fibrinogen ist, folgt hier zunächst das Protokoll zur Isolation von Fibrinogen aus Blut und im Anschluss die Beschreibung des Polymerisationsprotokolles für den Guß.

5.3.1 Gewinnung von autologem Fibrinogen

Zur Isolation von Fibrinogen aus Vollblut wurden zunächst die zellulären Bestandteile abzentrifugiert und so durch Abpipettieren des Überstandes plättchenarmes Plasma hergestellt. Eine Wiederholung dieses Vorganges zur Entfernung restlicher zellulärer Bestandteile ermöglichte die Gewinnung von plättchenfreiem Plasma. Durch Cryopräzipitation konnte dann aus plättchenfreiem Plasma Fibrinogen isoliert werden.

5.3.1.1 Gewinnung von Plättchenfreiem Plasma (PFP)

Schafsblut wurde mit 10% einer 3,13%igen *Citratlösung* (Natriumcitrat 3,13% Eifelfango) antikoaguliert. Der Transport des Blutes erfolgte

5 Material und Methoden

in einer leeren Plastikflasche für *sterile Natriumchloridlösung* (Delta-Pharma Kochsalz Spüllösung 0,9%). Das antikoagulierte Blut wurde mit 3000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand ist plättchenarmes Plasma. Nach Abpipettieren wurde dieses erneut für 20 min bei 3000 g zentrifugiert, um den Überstand von restlichen Thrombozyten zu reinigen. Das Plättchenfreie Plasma wurde bei -80°C eingefroren.

5.3.1.2 Gewinnung von Fibrinogen aus Plättchenfreiem Plasma

Bei -80°C eingefrorenes PFP wurde bei 4°C über Nacht langsam aufgetaut. Durch diesen Prozeß fällt ein Proteingemisch, das zum größten Teil aus Fibrinogen besteht, aus dem Plasma aus [67]. Dieses Präzipitat wurde mit 3000 g bei 4°C für 20 Minuten abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde mit 4°C kaltem Aqua dest. vorsichtig aufgefüllt und für 3 Minuten unter den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Proteinpellet bei der Verwendung von Schweineblut oder Schafsblut im Verhältnis 1/12,5 (im Vergleich zur Menge des aufgetauten Plättchenfreien Plasmas) mit *Trisma Buffered Saline* gelöst, bei Humanblut im Verhältnis 1/25. Nun wurde die Lösung über Nacht in einem *Dialysefilter* (Spectra Por1 Dialysefilter MWCO 6000-8000) gegen 4l *Trisma Buffered Saline*, bestehend aus

- 4,91 g/l Trizma HCl (Sigma T-3253)
- 0,72 g/l Trizma Base (Sigma T-6066)
- 9,00 g/l NaCl (Sigma S-9625)
- 0,23 g/l KCl (Merck 1.04936.0500)
- in Aqua dest. lösen

- pH auf 7,40 einstellen

über Nacht dialysiert und durch einen *Spritzenfilter* (Millipore Millex GP 0,22 µm SLGP033R3) sterilfiltriert. Die Proteinkonzentration konnte bei 280 nm im *Spektrometer* (ThermoSpectronic Genesys 6) nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Proteinkonzentration(mg/dl)} = \frac{\text{Absorptionskoeff.} * \text{Dilution}}{1,55}$$

5.3.2 Ansetzen von industriell isoliertem Humanfibrinogen

Um industriell hergestelltes, lyophilisiertes Humanfibrinogen als Scaffoldmaterial verwenden zu können, mußte dieses zunächst in Lösung gebracht werden; dazu wurden zunächst in Petrischalen fünfmal je 50 mg *Humanfibrinogen* (Sigma F4883) auf je 2 ml Reinstwasser gegeben. Innerhalb einer halben Stunde ging das lyophilisierte Fibrinogen unter diesen Bedingungen in Lösung. Nun wurde diese Lösung über Nacht im *Dialysefilter* gegen 4l *Trizma Buffered Saline* dialysiert und durch einen *Spritzenfilter* sterilfiltriert. Die Proteinkonzentration konnte bei 280 nm im *Spektrometer* bestimmt werden.

5.3.3 Gießen von Fibringelen

Zum Gießen von Fibringelen wurde eine Lösung aus 50% Fibrinogen, 7,5% *Thrombinlösung* und 7,5% 50mM *CaCl₂ Lösung*, 35% *Trizma buffered Saline* und den zu integrierenden Zellen hergestellt. Die Zellen konnten vorher in *Trizma buffered Saline* aufgenommen werden.

5 Material und Methoden

- Thrombinlösung
 - 40 U/ml Thrombin (Sigma T-4648) in Trizma Buffered Saline lösen
 - Sterilfiltration durch Spritzenfilter
- CaCl₂ Lösung
 - 5,55 g/l CaCl₂ (Sigma C-3881) in Trizma Buffered Saline lösen
 - Sterilfiltration durch Spritzenfilter

Die angesetzte Lösung wurde zügig in eine beliebige Gußform gegeben. Dabei musste umsichtig vorgegangen werden, um der Entwicklung von Luftblasen vorzubeugen. Nach 45 Minuten war das Gel fest genug, um es aus einer Gußform herauszulösen; die endgültige Härtung konnte nach 12 Stunden beobachtet werden. Die Durchführung des Gußprozesses war bei Raumtemperatur möglich.

5.4 Kultur im Bioreaktorsystem

Für die Kultur der nach den in Kapitel 5.3 und 4.1 beschriebenen Verfahren hergestellten Klappe wurde das in Kapitel 4.3 dargestellte Bioreaktorsystem eingesetzt.

Nach Guß der Klappe in das Silikonconduit wurde dieses unter sterilen Bedingungen in das Bioreaktorsystem eingesetzt und mit 250 Millilitern *Kulturmedium*, bestehend aus

- 89 % DMEM low glucose (Gibco 21885-025)
- 10 % Fötalem Kälberserum (Gibco 10270-160)

- 1 % Antibiotisch-antimykotischer Lösung (Gibco, 15240-062)
- 130 KIU Aprotin pro Milliliter Medium (Trasyolol, Bayer)
- 0,296 Milligramm Ascorbinsäure pro Milliliter Medium (Sigma A8960-5G)

befüllt. Der Gasaustausch erfolgte über den beschriebenen Gasaustauschkreislauf, der mit einer Rollerpumpe (ISMATEC MCP Process) bei einer Flußrate von 100 Millilitern pro Minute betrieben wurde. Als Windkessel diente bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur sterilen Entlüftung ein flexibler, leerer Infusionsbeutel. Zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Milieus hinsichtlich Sauerstoff- und Kohlendioxydkonzentration sowie der Temperatur wurde der Bioreaktor in einem Inkubator bei einer CO₂-Konzentration von 5 % und 37°C Temperatur betrieben.

5.4.1 Evaluation verschiedener Kulturbedingungen

Zur Evaluation verschiedener Kulturbedingungen wurden

- die Konzentration von Fibrinogen C_F ,
- die eingegossene Zellzahl N ,
- die Schlagfrequenz F ,
- die diastolische Last auf den Klappensegeln P ,
- und unterschiedliche Fixationsmöglichkeiten des Fibringels am Silikonconduit

bei einer Kulturdauer von 12 Tagen untersucht (vgl. Tabelle 5.1). Dabei wurde das Kulturmedium alle 3 Tage ausgetauscht.

Tabelle 5.1: Evaluation unterschiedlicher Bedingungen bei der Kultur einer tissue-engineerten Klappe im Bioreaktorsystem. Die Kulturdauer betrug 12 Tage.

Veränderte Größe	C_F (mg / ml Gel)	N (n / ml Gel)	F (n / min)	P (cm H_2O)	Fixation
C_F	5 / 10 / 20	10	5 zu Anfang, 10 ab dem 6. Tag der Kultur	2	PVDF-Textilstruktur
N	5	2,5 / 5 / 10	5 zu Anfang, 10 ab dem 6. Tag der Kultur	0	PVDF-Textilstruktur
F	5	2,5	5 / 10 / 15 / 5 zu Anfang, 10 ab dem 6. Tag der Kultur	0	Keine
P	5	2,5	5 zu Anfang, 10 ab dem 6. Tag der Kultur	0 / 2	Keine
Fixation	5	2,5	5 zu Anfang, 10 ab dem 6. Tag	0	Keine / Einzelknopfnähte / Dacron / PVDF-Textilstruktur

5.4.2 Analyse der Gewebeentwicklung

Zur genaueren Analyse der Gewebeentwicklung wurden Klappen unter den in Tabelle 5.3 genannten Bedingungen für 6, 12, 24 und 30 Tage kultiviert, um die Prozesse bei der Entwicklung des tissue-engineerten Gewebes im zeitlichen Verlauf beobachten zu können.

Tabelle 5.3: Versuchsbedingungen für die Untersuchung der Gewebeentwicklung über 6, 12, 24 und 30 Tage.

Versuch	Gewebeentwicklung über 6, 12, 24 und 30 Tage
Fibrinogenkonzentration	5 mg pro ml Gel
Zellzahl	2,5 Millionen Zellen / ml Gel
Schlagfrequenz	5 / min zu Anfang, 10 / min ab dem 6. Tag
diastolische Last	0 cm H ₂ O
Fixation	keine

5.4.3 Kultur unter optimierten Bedingungen

Abschließend wurde eine Versuchsreihe unter den im Rahmen dieser Arbeit herausgearbeiteten optimalen Bedingungen für die Entwicklung tissue-engineerter Semilunarklappen auf Fibrinogelbasis durchgeführt (vgl. Tabelle 5.4). Die Klappen wurden für 12 Tage im Bioreaktorsystem belassen und die Gewebeentwicklung mit der Entwicklung unter den Bedingungen erleichterter Diffusion verglichen. Dazu wurde eine Kontrollserie mit Klappen, die die gleiche Fibrinogenkonzentration, Zellmenge und Fixation aufwiesen und deren Zellen aus der gleichen Primärkultur stammten, durchgeführt. Die gegossenen Klappen wurden in ein steriles Becherglas, gefüllt mit dem oben beschriebenen Nährmedium, gegeben. Um die Nährstoffversorgung des Gewebes zu erleichtern,

5 Material und Methoden

wurde das Medium für die Dauer der Kultur mit Hilfe eines Rührfisches durchmischt.

Tabelle 5.4: Versuchsbedingungen für die Untersuchung der Gewebeentwicklung unter optimierten Bedingungen

Versuch	Gewebeentwicklung unter optimierten Bedingungen
Fibrinogenkonzentration	5 mg pro ml Gel
Zellzahl	10 Millionen Zellen / ml Gel
Schlagfrequenz	5 / min zu Anfang, 10 / min ab dem 6. Tag
diastolische Last	2 cm H ₂ O
Fixation	PVDF - Textilstruktur

5.5 Herstellung von Paraffinschnitten

Nach Ende der jeweiligen Kulturdauer wurden die Klappen aus dem Reaktor herausgenommen, der Silikonmantel und die Klappe aufgeschnitten, mit Maßstab fotografiert und ein Drittel der Klappe Carnoyfixiert, in Paraffin eingebettet und der Histologie und Immunhistochemie zugeführt.

Für die Histologie bestimmte Gewebestücke wurden in Einbettkassetten gelegt und über einen Zeitraum von vier Stunden in frisch angesetztem Carnoy-Fixativ fixiert.

Carnoy-Fixativ:

- 60% Methanol (Sigma M1775)
- 30% Chloroform (Sigma C2432)
- 10% Eisessig (Sigma A-6283)

Anschließend wurden die Gewebstücke durch sukzessives Überführen in 60%, 80%, 90% und 100% Isopropanollösungen (Isopropanol Merck K30957024) und 100% Xylollösung (Sigma 296325) für je eine halbe Stunde entwässert, um sie dann über ein 50%-Xylol-Paraffin Gemisch in reines Paraffin (Paraffin-Pastillen Merck K29908058-237) zu bringen, in dem sie über Nacht liegen sollten.

An einem Ausblock-Automaten (Leica GmbH) wurden die Gewebstücke in Paraffinblöcke eingegossen, um später mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms drei Mikrometer dicke Schnitte anzufertigen. Diese Schnitte wurden in 37°C warmen Wasser gestreckt und auf Objektträger (SuperFrost Plus Menzel GmbH & Co. KG J1800AMNZ) aufgezogen. Vor Lagerung mußten diese Schnitte noch zwölf Stunden bei 56°C getrocknet werden.

Direkt vor der Verwendung für eine histologische oder immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger nacheinander für dreimal fünf Minuten in Xylol, zweimal fünf Minuten in Ethanol (Sigma 459836) und je einmal fünf Minuten in 96%, 80% und 70% Ethanol gebracht. Bis zur Verwendung sollten sie in destilliertem Wasser äquilibriert werden.

5.6 HE-Färbung (nach [73])

Das entparaffinierte Präparat wurde mit einem Fettstift (Dako Cytomation S 2002) umrandet und dann für 7 Minuten mit Mayers Hämalaun (Fertiglösung, Merck 1.09249.0500) überschichtet. Danach wurde das Präparat für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Aktivierte Eosinlösung (Eosin Y Fertiglösung (*Sigma HT110-2-16*) mit einigen Tropfen Eisessig (*Sigma A-6283*)) wurde anschließend für 30 Sekunden über das Präparat geschichtet, um es nun eine Minute unter fließendem Leitungswasser zu spülen. Schließlich wurde das Präparat

5 Material und Methoden

durch 5-sekündiges Eintauchen in 70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Isopropanol und 100% Xylol einbettungsfähig gemacht. Die Einbettung erfolgte in Balsam (Euparal, Roth 7356.1) .

Durch diese Färbung werden Zellkerne, Kalk, saure Mukosubstanzen und grampositive Bakterien blau gefärbt; alle übrigen Gewebebestandteile in unterschiedlichen Rotabstufungen. Durch diese einfache Färbung kann also ein grober Überblick über die mikroskopische Morphologie eines Gewebes gewonnen und insbesondere die Morphologie der Zellen gut beurteilt werden. Außerdem stellt die HE-Färbung eine wenig fehleranfällige Methode dar.

5.7 Gomoris Trichrome Färbung (nach [74])

Das entparaffinierte Präparat wurde mit einem Fettstift umrandet und dann in Bouin'scher Lösung bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

Bouinsche Lösung:

- 15 ml gesättigte wässrige Pikrinsäure (Sigma 925-40)
- 5 ml Formol (Sigma F-1268)
- 1ml Eisessig (Sigma A-6283)

Das Präparat wurde am nächsten Tag solange in fließendem Leitungswasser ausgewaschen, bis keine gelbe Färbung mehr erkennbar war. Danach wurde das Präparat für 10 Minuten mit Weigerts Eisenhämatoxylin (ein Teil Eisenhämatoxylin Lösung A (*Chroma 2E032*) mit einem Teil Eisenhämatoxylin Lösung B (*Chroma 2E052*)) überschichtet und anschließend für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Nun erfolgte eine Färbung mit Trichrom Färbelösung für 30 Minuten und im Anschluss daran kurzes Spülen mit Leitungswasser.

Trichrom Färbelösung :

- 0,6 g Chromotrop 2R (Chroma 1B259)
- 0,3 g Anilinblau (Chroma 1B501)
- 0,8 g Phosphorwolframsäure (Chroma 3D092)
- in 100 ml Aqua dest. lösen
- 1 ml Eisessig (Sigma A-6283) hinzufügen

Zur Einbettung wurde das Präparat schnell hintereinander in 96% Ethanol, 100% Ethanol, 100% Isopropanol und 100% Xylol gebracht, um schließlich in Balsam eingeschlossen zu werden.

Durch Gomoris Trichrome Färbung werden Kerne blauschwarz und Zytoplasma rotgefärbt, Kollagenfibrillen und saure Mukosubstanzen erscheinen in Blautönen. Dadurch ermöglicht diese Färbung verglichen mit der HE-Färbung eine genauere Beurteilung der Zusammensetzung des extrazellulären Raumes insbesondere hinsichtlich der Kollagenbildung.

5.8 Immunhistochemie

Das in Carnoy-Lösung fixierte und entparaffinierte Präparat wurde zunächst mit 5 % Standard-Schafsserum (Sigma) in 0,1 % Triton-PBS Lösung behandelt, um unspezifische Antikörperbindungsorte zu neutralisieren und die Zellen für Antikörper zugänglich zu machen.

Danach wurden die Präparate für 1 Stunde bei 37°C mit dem jeweiligen Primäntikörper inkubiert, der entsprechend Tabelle 5.5 mit 5 % Standard-Schafsserum in 0,1 % Triton-PBS verdünnt wurde. Danach wurden die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit den

5 Material und Methoden

entsprechenden und entweder Rhodamin oder Fluorescein konjugierten Sekundärantikörpern (Molecular Probes, Leiden, Niederlande; vgl. Tabelle 5.5) in einer Konzentration von 1 : 400, auch gelöst in 5 % Standard-Schafsserum in 0,1 % Triton-PBS, inkubiert. Die Zellkerne wurden zuletzt mit DAPI (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) gegengefärbt.

Als Positivkontrolle diente natives ovines Aortenklappengewebe. Für Negativkontrollen wurden Schnitte anstatt mit dem Primärantikörper ausschließlich mit 5 % Standard-Schafsserum in 0,1 % Triton-PBS inkubiert, ansonsten aber wie oben angegeben behandelt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte an einem AxioImager Mikroskop (Carl Zeiss GmbH) mit Hilfe einer gekühlten 3-Chip RGB Kamera (JVC KY-F75U; JVC, Yokohama, Japan).

Tabelle 5.5: Primärantikörperverdünnungen und entsprechende Sekundärantikörper

Primärantikörper	Bezugsquelle	Verdünnung	Sekundärantikörper
Anti - Vimentin	Sigma	1 : 150	Anti - Maus
Anti - Alpha-Smooth-Muscle-Actin	Sigma	1 : 400	Anti - Maus
Anti - von-Willebrand-Faktor	Dako Cytomation	1 : 200	Anti - Kaninchen
Anti - Fibrinogen	Dako Cytomation	1 : 60	Anti - Kaninchen
Anti - Prolyl-4-Hydroxylase	DPC Biermann	1 : 25	Anti - Maus
Anti - Kollagen I	DPC Biermann	1 : 100	Anti - Maus
Anti - Kollagen III	DPC Biermann	1 : 100	Anti - Kaninchen
Anti - Kollagen V	DPC Biermann	1 : 150	Anti - Kaninchen
Anti - Elastin	Sigma	1 : 500	Anti - Maus
Anti - Fibronectin	Sigma	1 : 400	Anti - Kaninchen
Anti - Laminin	DPC Biermann	1 : 150	Anti - Kaninchen
Anti - Chondroitinsulfat	Sigma	1 : 200	Anti - Maus

5.9 **Verwendete Chemikalien**

- **Transportmedium:**
 - 8,00 g/l NaCl (Sigma S-9625)
 - 0,30 g/l KCl (Merck 1.04936.0500)
 - 2,38 g/l Hepes Sodium Salt (Sigma H-3784)
 - 2 g/l Glucose (Merck 1.08337.0250)
 - 10 ml/l antibiotisch-antimykotische Lösung (Gibco, 15240-062)
 - in Aqua dest. lösen
 - pH auf 7,5 einstellen
 - Verwendung gekühlt bei 4°C

- **Phosphate Buffered Saline (PAA H15-002)**

- **Kollagenaselösung:**
 - 1 mg/ml Kollagenase Typ IA (Sigma C2674)
 - in Aqua dest.
 - Lagerung von 10 ml Aliquots bei -20°C
 - Verwendung vorgewärmt bei 37°C

- **Kulturmedium DMEM low glucose (Gibco 21885-025)**

- **Fötales Kälberserum (Gibco 10270-160)**

- **Antibiotisch-antimykotische Lösung (Gibco, 15240-062)**

- **Gelatinelösung**
 - Kaisers Glyceringelatine (Merck, 1.09242.0100)

- 1% in Aqua dest. lösen
 - Autoklavieren bei 121°C für 15 Minuten
 - Verwendung bei Raumtemperatur
- Trypsin / EDTA Lösung:
 - Trypsin 0,5g/l mit EDTA 0,2g/l (PAA L11-004)
- Trizma Buffered Saline
 - 4,91 g/l Trizma HCl (Sigma T-3253)
 - 0,72 g/l Trizma Base (Sigma T-6066)
 - 9,00 g/l NaCl (Sigma S-9625)
 - 0,23 g/l KCl (Merck 1.04936.0500)
 - in Aqua dest. lösen
 - pH auf 7,40 einstellen
- Thrombinlösung
 - 40 U/ml Thrombin (Sigma T-4648) in Trizma Buffered Saline lösen
 - Sterilfiltration durch Spritzenfilter
- CaCl₂ Lösung
 - 5,55 g/l CaCl₂ (Sigma C-3881) in Trizma Buffered Saline lösen
 - Sterilfiltration durch Spritzenfilter
- Citratlösung
 - Fertiglösung Natriumcitrat 3,13% (Eifelfango)

5 Material und Methoden

- Sterile NaCl Lösung (Delta-Pharma Kochsalz Spüllösung 0,9%)
- Aprotininlösung (Trasylol, Bayer)
- Ascorbinsäure (Sigma A8960-5G)
- Formalin (Formalin 10% Sigma HT50-1-128)
- Carnoy-Fixativ
 - 60% Methanol (Sigma M1775)
 - 30% Chloroform (Sigma C2432)
 - 10% Eisessig (Sigma A-6283)
- Isopropanol (Merck K30957024)
- Xylol (Sigma 296325)
- Ethanol (Sigma 459836)
- Paraffin (Paraffin-Pastillen Merck K29908058-237)
- Mayers Hämalaun:
 - Fertiglösung (Merck 1.09249.0500)
- Aktivierte Eosinlösung:
 - Aktivierung eines Aliquots Eosin Y Fertiglösung (Sigma HT110-2-16)
 - durch einige Tropfen Eisessig (Sigma A-6283)
- Bouinsche Lösung:
 - 15 ml gesättigte wässrige Pikrinsäure (Sigma 925-40)
 - 5 ml Formol (Sigma F-1268)

- 1ml Eisessig (Sigma A-6283)
- Weigerts Eisenhämatoxylin
 - Ein Teil Eisenhämatoxylin Lösung A (Chroma 2E032)
 - mit einem Teil Eisenhämatoxylin Lösung B (Chroma 2E052) mischen
- Trichrom Färbelösung
 - 0,6 g Chromotrop 2R (Chroma 1B259)
 - 0,3 g Anilinblau (Chroma 1B501)
 - 0,8 g Phosphorwolframsäure (Chroma 3D092)
 - in 100 ml Aqua dest. Lösen
 - 1 ml Eisessig (Sigma A-6283) hinzufügen

5.10 Verwendete Materialien

- Mullkompressen (Maimed 25070)
- Nabelschnurklemmen (Sarstedt MPL 74.4701)
- Knopfkanülen (WDT 07512)
- Kulturflaschen T 75 (Falcon 353136)
- Petrischalen (Sarstedt 83.1802)
- Serologische Pipetten (Falcon 357543)
- Pasteurpipetten (Brand 747720)
- Kulturflaschen T 75 (Falcon 353136)

5 *Material und Methoden*

- Dialysefilter (Spectra Por1 Dialysefilter MWCO 6000-8000)
- Spritzenfilter (Millipore Millex GP 0,22 μ m SLGP033R3)
- Spritzen 20 ml (Becton Dickinson Discardit II)
- Einbettkassetten (Marienfeld Laboratory Glassware 5252604)
- Objektträger (SuperFrost Plus Menzel GmbH & Co. KG J1800AMNZ)
- Fettstift (Dako Cytomation S 2002)

5.11 Verwendete Geräte

- Zentrifuge (Sigma 3K15)
- CO₂-Inkubator (Sanyo MCO 17-AIC)
- Sterilwerkbank (Heraeus HERAsafe)
- Autoklav (Systec 2540EL)
- Spektrometer (ThermoSpectronic Genesys 6)
- Ausblock-Automat (Leica GmbH)
- Schlittenmikrotom (Leica GmbH)

6 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, optimale Kulturbedingungen für die Entwicklung tissue-engineerter Semilunarklappen auf Fibringelbasis herauszuarbeiten. Dazu wurden Klappen zunächst nach einem auf Literaturangaben basierten Protokoll über Zeiträume von bis zu 30 Tagen kultiviert, um zunächst einen ersten Eindruck der Gewebeentwicklung im vorgestellten Bioreaktor zu gewinnen. Anschließend wurden in Einzelversuchen die Parameter untersucht, welche die Entwicklung des Gewebes beeinflussten. Abschließend erfolgte eine Versuchsreihe über 12 Tage mit den hierbei herausgearbeiteten optimalen Bedingungen.

Alle Klappen für diese Versuche wurden mit der in Kapitel 4.1 vorgestellten Gußform hergestellt, wobei Gußstempel aus der Version II zur Anwendung kamen (vgl. Abbildung 4.4). Danach wurden die Klappen unter unterschiedlichen Bedingungen im Bioreaktorsystem kultiviert.

6.1 Entwicklung des Gewebes über 30 Tage

Die Gewebeentwicklung in einer tissue-engineerten Herzklappe auf Fibringelbasis wurde in einer Versuchsreihe über bis zu 30 Tage verfolgt.

Dazu wurden Klappen mit einer Fibrinogenkonzentration von 5 Milligramm pro Milliliter gegossen. Die Klappen enthielten 2,5 Millionen Zellen pro Milliliter und wurden nicht gesondert am Silikonmantel befestigt. Im Bioreaktor wurden sie dann mit einer Frequenz von 5 pro

6 Ergebnisse

Minute und mit einer Frequenz von 10 pro Minute ab dem sechsten Tag kultiviert. Dabei wurde keine diastolische Last auf die Klappensegel angelegt. Es wurden vier Versuchsläufe mit einer Dauer von 6, 12, 24 und 30 Tagen durchgeführt.

In der trichromgefärbten Übersichtsvergrößerung zeigen (vgl. Abbildung 6.1, c) die eingegossenen Myofibroblasten nach 6 Tagen eine längliche Form und beginnen ein Netzwerk zu bilden. In der HE-Färbung (vgl. Abbildung 6.1, a) bestätigt sich dieser Eindruck, jedoch finden sich auch Zellen mit kleinen Zellkernen, abgekugelter Form und blassem Zellkörper. Nur vereinzelt finden sich Anzeichen der Produktion extrazellulärer Matrixproteine, welche in der Trichromfärbung blau erscheinen.

Nach 12 Tagen (vgl. Abbildung 6.1, b und d) hat sich ein Netzwerk aus Zellen entlang des Gefäßstammes entwickelt. Die meisten Zellen haben eine längliche Form und erscheinen in das Fibringel integriert. Zellen mit abgekugelter Form, kleinem Zellkern und blassem Zellkörper sind nur noch vereinzelt zu finden.

Erst nach 24 Tagen beginnt die Trichromfärbung (vgl. Abbildung 6.2, c) Hinweise auf eine ausgeprägte Syntheseleistung der Zellen in Form extrazellulärer Matrixproteine zu geben. Entlang der Gefäßwand scheint eine besonders ausgeprägte Vernetzung der Zellen stattzufinden.

Nach 30 Tagen hat sich ein dichter Gewebeverband entwickelt. In der HE-Färbung (vgl. Abbildung 6.2, b) sind keine Zellen mit Anzeichen des Zellunterganges mehr erkennbar, sondern alle Zellen erschienen spindelförmig in das Gewebe eingebettet.

Die Trichromfärbung (vgl. Abbildung 6.2, d) zeigt innerhalb der Gefäßwand eine deutliche Schichtung in eine äußere Schicht, in der locker in extrazelluläre Matrix eingelagerte Zellen zu erkennen sind, und eine weiter innen liegende Schicht, in der tiefrot angefärbte Muskelzellen ein dichtes Netzwerk bilden.

6.1 Entwicklung des Gewebes über 30 Tage

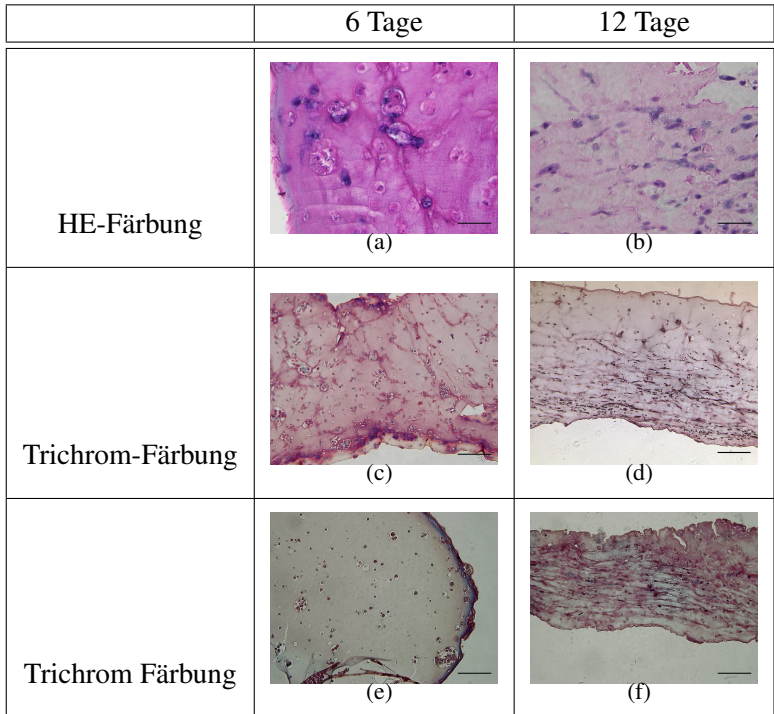


Abbildung 6.1: Gewebeerwicklung über 30 Tage, Teil 1 (6 und 12 Tage): Trichrom- und HE-Färbung der Übergangsregion zwischen Pulmonalarterie und Klappensegel (a – d) und des Klappensegels (e – f). In der HE Färbung nach 6 und 12 Tagen (a, b) noch Anzeichen des Zellunterganges. Im Verlauf Abnahme dieser, und Nachweis von in die extrazelluläre Matrix eingebetteten Zellen (6.2 a, b). Maßstab: a-b Balkenlänge 37,5 μm ; c-f Balkenlänge 150 μm .

6 Ergebnisse

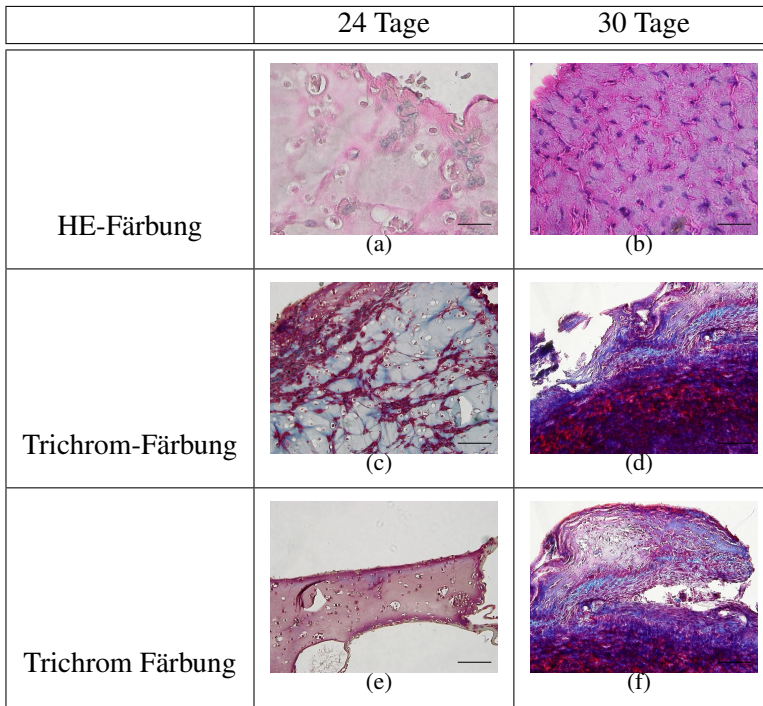


Abbildung 6.2: Gewebeentwicklung über 30 Tage, Teil 2 (24 und 30 Tage): Trichrom- und HE-Färbung der Übergangsregion zwischen Pulmonalarterie und Klappensegel (a – d) und des Klappensegels (e – f). Die Trichromfärbung läßt nach 24 Tagen (c) eine geringe Produktion extrazellulärer Matrixproteine erkennen. Nach 30 Tagen ist im Gewebe ein dichtes Netzwerk extrazellulärer Matrixproteine vorhanden (d). Innerhalb des Klappensegels entwickelte sich eine Zweisichtung des Gewebes (f), vergleichbar mit Spongiosa und Fibrosa einer nativen Pulmonalklappe. Maßstab: a-b Balkenlänge 37,5 μm ; c-f Balkenlänge 150 μm .

Auch innerhalb des Klappensegels lassen sich zwei Schichten abgrenzen (vgl. Abbildung 6.2, f): zur pulmonalen Gefäßwand hin eine Schicht, in der die Zellen ein dichtes Netzwerk mit starker Produktion extrazellulärer Matrixproteine bilden, und eine ventriuläre, zum Mediumstrom gerichtete, etwas lockerer strukturierte Schicht, die eine geringere Menge von extrazellulärer Matrix und Zellen enthält. Dieser Aufbau erinnert an die Schichtung einer nativen Pulmonalklappe in Fibrosa und Spongiosa (vgl. Kapitel 2.2.2).

6.2 Auswirkungen unterschiedlicher Schlagfrequenzen auf die Entwicklung des Gewebes

Um die Kulturbedingungen für tissue-engineerte Herzklappen auf Fibrinogelbasis zu optimieren, wurden die Auswirkungen der Schlagfrequenz auf die Gewebeentwicklung untersucht. Dazu wurden Klappen mit einer Fibrinogenkonzentration von 5 Milligramm pro Milliliter Gel und 2,5 Millionen ovinen Myofibroblasten pro Milliliter Gel für zwölf Tage im Bioreaktorsystem ohne diastolische Last auf den Klappensegeln kultiviert. Es wurden Pulsfrequenzen von 5, 10 und 15 Schlägen und von zunächst 5 Schlägen pro Minute und dann, ab dem sechsten Tag, 10 Schlägen pro Minute gewählt. Nach 12 Tagen erfolgte die Entnahme aus dem Reaktorsystem.

Im trichromgefärbten Übersichtspräparat zeigt sich bei Schlagfrequenzen von 5 und 15 Schlägen pro Minute nach 12 Tagen keinerlei Gewebsentwicklung; die Zellen erscheinen abgekugelt. In der stärker vergrößerten HE-Färbung bestätigt sich der Eindruck unphysiologisch abgekugelter Zellen, wobei sie nach 12 Tagen bei einer Frequenz von 15 Schlägen pro Minute Nekrosezeichen im Sinne einer schwachen Kernfärbung und Kernauflösung (Cariorexesis) zeigen. Außerdem scheinen

6 Ergebnisse

die Zellen nicht gut in das Fibrinigel eingebaut; zum Teil bilden sich größere Höfe um die Zellen, was jedoch auch fixationsbedingt auftreten kann.

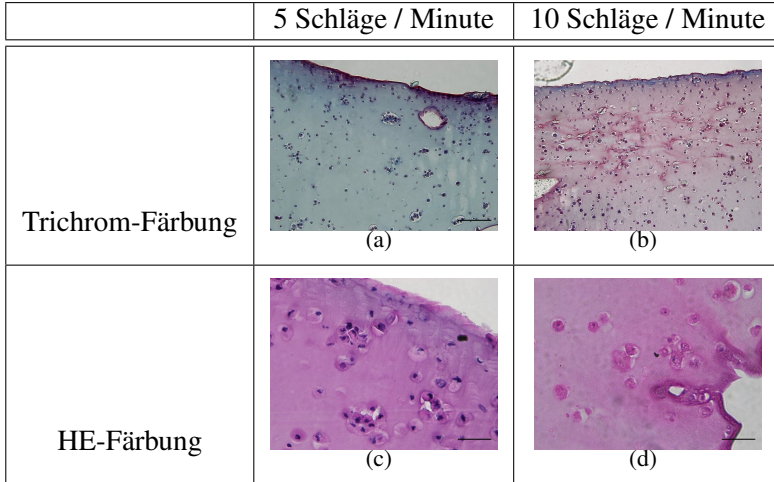


Abbildung 6.3: Einfluß der Schlagfrequenz auf die Gewebeentwicklung, Teil 1: HE-Färbung (c - d) und Trichromfärbung (a - b) der Übergangsregion zwischen Pulmonalarterienstamm und Klappensegel. Nach 12 Tagen Kultur bei Frequenzen von 5 beziehungsweise 15 Schlägen pro Minute keine Gewebeentwicklung. In der HE-Färbung erscheinen die Zellen bei einer Frequenz von 5 Schlägen / Minute (c) nach 12 Tagen Kultur abgekugelt, bei einer Frequenz von 15 Schlägen pro Minute (Abb. 6.4, c) kommen direkte Zeichen des Zellunterganges im Sinne einer abgeschwächten Kernfärbung und Cariorhexis zur Darstellung; in den Trichrom-gefärbten Präparaten (a und Abb. 6.4, a) ist keine Bildung extrazellulärer Matrixproteine nachweisbar. Maßstab: Balkenlänge c-d 37,5 μm , a-b 150 μm .

Bei einer Schlagfrequenz von 10 pro Minute fallen nach 12 Tagen erste Anzeichen für eine beginnende Gewebeentwicklung ins Auge: die Zellen erscheinen in der stark vergrößerten HE Färbung gut in das Fi-

108

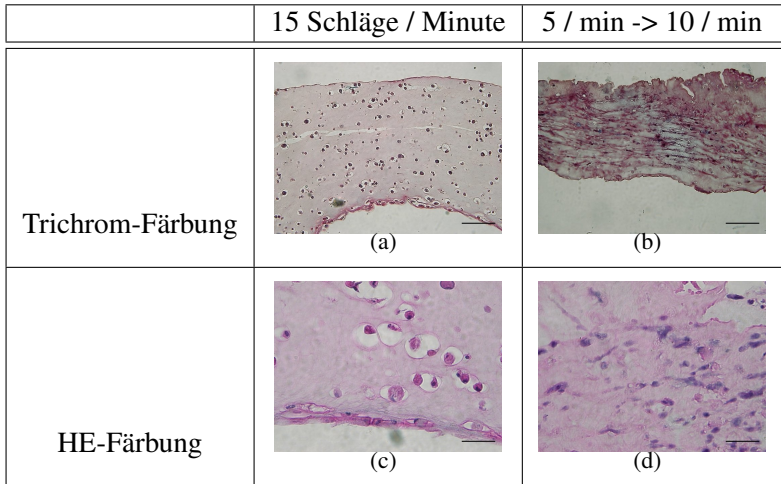


Abbildung 6.4: Einfluß der Schlagfrequenz auf die Gewebeerwicklung, Teil 2: HE-Färbung (c - d) und Trichromfärbung (a - b) der Übergangsregion zwischen Pulmonalarterienstamm und Klappensegel. Bei einer Schlagfrequenz von 10 Schlägen pro Minute fallen in der HE-Färbung (Abb. 6.3, d) länglich ausgezogene und gut in das Fibringel eingebaute Zellen auf; die Trichromfärbung (Abb. 6.3, b) liefert zwischen den Zellfortsätzen erste Hinweise auf eine Produktion extrazellulärer Matrixproteine. Bei Beginn der Kultur mit einer Pulsfrequenz von 5 Schlägen pro Minute und Steigerung der Frequenz auf 10 Schläge pro Minute ab dem sechsten Tag läßt sich nach insgesamt 12 Tagen Kultur ein entlang der Gefäßwand orientierter Gewebeverband mit schwacher Produktion extrazellulärer Matrixproteine nachweisen (c und d). Maßstab: Balkenlänge c-d 37,5 μm , a-b 150 μm .

6 Ergebnisse

bringel eingebaut und nehmen etwa zur Hälfte eine eher physiologisch anmutende, längliche Form an. In der trichromgefärbten Übersichtsvergrößerung scheinen die Zellen über ihre Fortsätze zum Teil im Sinne einer Gewebsbildung Kontakt zueinander zu finden.

Eine anfängliche Schlagfrequenz von 5 Schlägen und 10 Schlägen pro Minute ab dem sechsten Kulturtag führt nach 12 Tagen zu einem in der Trichromfärbung erkennbaren, entlang der Gefäßwand orientierten Zellverband. In der HE-Färbung zeigen alle Zellen eine physiologisch langgestreckte Form bei einem guten Einbau ins Fibringel.

Makroskopisch zeigte sich nur bei einer Startfrequenz von 5 pro Minute und 10 Schlägen ab dem sechsten Tag eine Veränderung gegenüber dem Zustand direkt nach dem Guß: Die Klappe war nach 12 Tagen Kultur insuffizient und löste sich vom Silikonmantel ab. Das Gewebe war dem Empfinden nach widerstandsfähiger als direkt nach dem Gußprozeß.

6.3 Auswirkungen unterschiedlicher Zellzahlen auf die Gewebeentwicklung

Zur Ermittlung der optimalen in die Klappe einzugießenden Zellzahl wurden wiederum Klappen mit einer Fibrinogenkonzentration von 5 Milligramm pro Milliliter gefertigt. In diese Klappen wurden 2,5, 5 und 10 Millionen Myofibroblasten pro Milliliter Gel eingegossen. Diese Klappen wurden für zwölf Tage im Bioreaktorsystem ohne diastolische Last auf den Klappensegeln bei einer Schlagfrequenz von zunächst 5 pro Minute und 10 pro Minute ab dem sechsten Tag kultiviert. Nach dem ersten Versuch mit 10 Millionen Zellen pro Milliliter Gel wurde eine proximale und distale Befestigung der Klappen mit einer grobmashigen Textilstruktur aus PVDF eingeführt (vgl. Kapitel 4.1.3).

Im trichromgefärbten Übersichtspräparat zeigte sich mit Erhöhung der

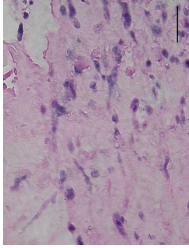
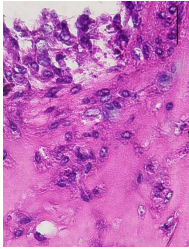
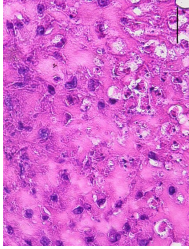
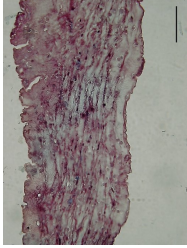
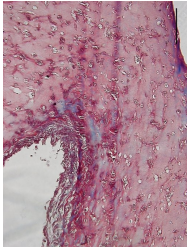
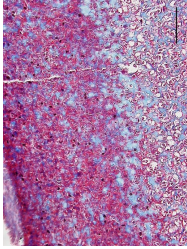
	$\frac{2,5 \text{ Mio Zellen}}{\text{ml Gel}}$	$\frac{5 \text{ Mio Zellen}}{\text{ml Gel}}$	$\frac{10 \text{ Mio Zellen}}{\text{ml Gel}}$
HE-Färbung	 (a)	 (b)	 (c)
Trichrom-Färbung	 (d)	 (e)	 (f)

Abbildung 6.5: Einfluß der Zellzahl auf die Gewebeerwicklung: HE-Färbung (a - c) und Trichromfärbung (d - f) der Übergangsregion zwischen Pulmonalarterienstamm und Klappensegel. Mit steigender Zellzahl war eine vermehrte Produktion extrazellulärer Matrixproteine festzustellen (d - f). Bei 10 Millionen Zellen pro Milliliter Gel kam es zur Bildung von Höfen um die Zellen (c). Maßstab: Balkenlänge a-c 37,5 μm , d-f 150 μm .

6 Ergebnisse

Zellzahl eine stärkere Vernetzung des Zellverbandes und eine, im Trichrompräparat blau angefärbte, vermehrte Bildung extrazellulärer Matrixproteine. Im HE-gefärbten Präparat ließ sich bei allen Zellzahlen eine gute Integration der Zellen ins Fibringel nachweisen; allerdings kam bei Zellen, die bei einer Zellzahl von 10 Millionen Zellen pro Milliliter Gel in Richtung Gefäßaußenwand liegen, die Bildung von Höfen um die Zellen zur Darstellung. Alle Zellen in allen Präparaten wiesen eine längliche Spindelform auf, wie sie typisch für glatte Muskelzellen ist.

Makroskopisch zeigten sich starke Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen. Klappen mit 5 Millionen Zellen pro Milliliter Gel waren nach 12 Tagen insuffizient, und die Gefäßwand löste sich vom Silikonmantel. Bei 10 Millionen Zellen pro Milliliter Gel schrumpfte die Klappe ohne zusätzliche Befestigung auf einen Durchmesser von 8 Millimetern (vgl. Abbildung 6.6). Mit Befestigung durch einen Ring aus PVDF am proximalen und distalen Ende des Conduits (vgl. Kapitel 4.1) verschwand die Schrumpfung des Gefäßstückes. Die schnellere Gewebeentwicklung mit zunehmender Zellzahl schlug sich auch in einer größeren Widerstandsfähigkeit des kultivierten Gewebes mit höherer Zellzahl nieder.

6.4 Auswirkungen unterschiedlicher Befestigungsmöglichkeiten auf die Gewebeentwicklung

Um das Zusammenschrumpfen des kultivierten Gewebes zu verhindern, wurden verschiedene Befestigungsmöglichkeiten für die Klappe am Silikonmantel erprobt.

Das Fibringel wurde proximal und distal mittels Einzelknopfnähten oder schmalen Ringen aus Dacron beziehungsweise einer grobmaschi-

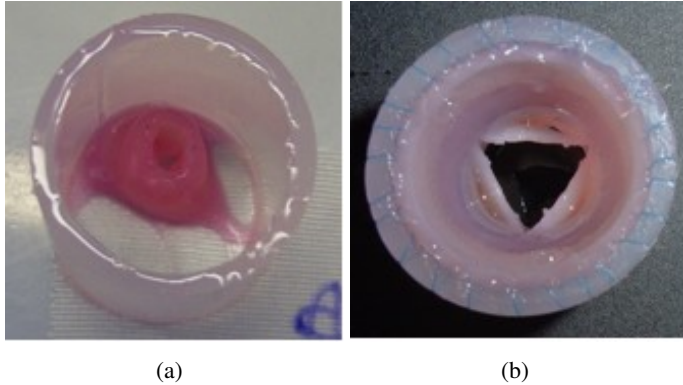


Abbildung 6.6: Gewebebefestigung am Silikonconduit. Es ist ein extremes Beispiel der Gewebeschrumpfung bei 10 Millionen eingegossenen Zellen pro Milliliter Gel ohne Befestigung (a) im Vergleich zur Befestigung mit einem PVDF-Streifen (b) am proximalen und distalen Ende des Gewebestückes abgebildet.

gen PVDF-Textilstruktur am Conduit fixiert; diese Befestigungsmöglichkeiten wurden gegeneinander evaluiert.

Es wurden Klappen mit einer Fibrinogenkonzentration von 5 Milligramm pro Milliliter und einer Zellkonzentration von 2,5 Millionen Myofibroblasten pro Milliliter Gel verwendet. Diese Klappen wurden zwölf Tage im Bioreaktorsystem ohne diastolische Last auf den Klappensegeln bei einer Schlagfrequenz von zunächst 6 pro Minute und 12 pro Minute ab dem sechsten Tag kultiviert.

Makroskopisch zeigte sich ohne Befestigung eine fast vollständige Ablösung der Klappe vom Silikonmantel. Die tissue-engineerte Struktur schrumpfte im Laufe der Kultur auf eine rundliche Struktur mit einem Durchmesser von 8 Millimetern zusammen, die sich sehr hart anfühlte.

Bei Befestigung mit Hilfe von Einzelknopfnähten oder Dacronstreifen bot sich ein ähnliches Bild. Das Gewebstück schrumpfte ebenfalls auf

6 Ergebnisse

etwa 6 Millimeter Durchmesser und wies Gewebebrücken bis zur Befestigung auf.

Bei Befestigung mit einer grobmaschigen Textilstruktur wies das durchgängige Gefäßlumen nach 12 Tagen einen Durchmesser von 17 Millimetern auf. Die Klappensegel schrumpften stark und waren insuffizient. Das Gewebe wurde als elastisch, aber widerstandsfähig, empfunden.

Im Bereich der Histologie zeigten sich zwischen den Versuchsansätzen keine Unterschiede.

6.5 Auswirkungen verschiedener Druckdifferenzen über die Klappe

Um der Schrumpfungstendenz der kultivierten Klappen eine Kraft entgegenzusetzen zu können, wurde das Bioreaktorsystem wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben modifiziert. So kann während der Diastole eine Last auf die Klappensegel ausgeübt werden. Es erfolgten Versuche mit einer diastolischen Last von 2 cmH₂O, die gegen gleichzeitig durchgeführte Versuche ohne diastolische Last evaluiert wurde. Dabei wurden Klappen mit einer Fibrinogenkonzentration von 5 Milligramm pro Milliliter Gel und 2,5 Millionen Zellen pro Milliliter Gel verwendet, die nicht am Silikonmantel befestigt waren. Die Klappen wurden für zwölf Tage im Bioreaktorsystem bei einer Schlagfrequenz von zunächst 6 pro Minute und 12 pro Minute ab dem sechsten Tag kultiviert.

Makroskopisch zeigte sich nach 12 Tagen Kulturdauer ohne Anlegen einer diastolischen Last eine stark geschrumpfte Klappe ohne durchgängiges Lumen und von geringer Elastizität. Der Durchmesser des Gewebestückes betrug 8 Millimeter.

Bei Anlegen einer Last von 2 cmH₂O während der Diastole lag die Gefäßwand nach Kultur weiterhin dem Silikonmantel an. Die Klappe

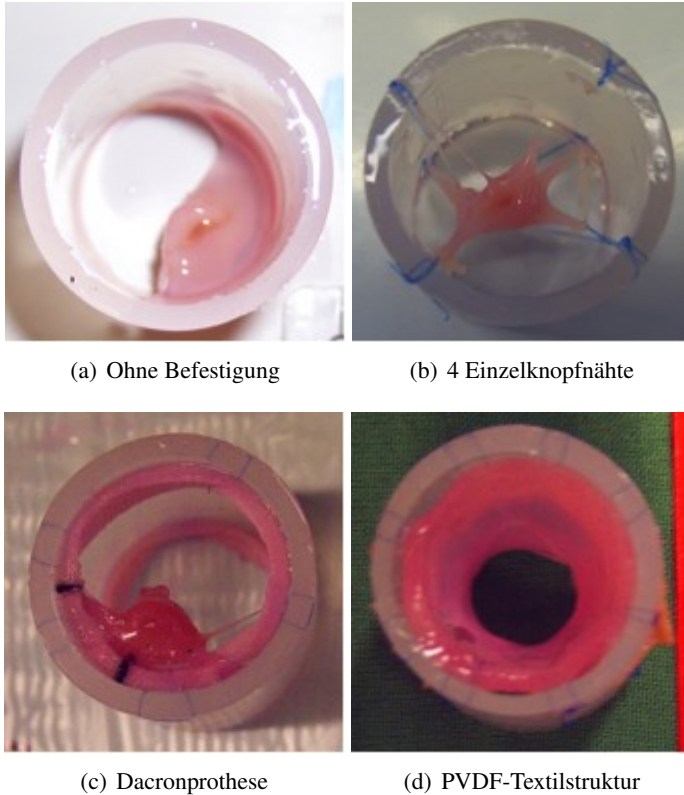
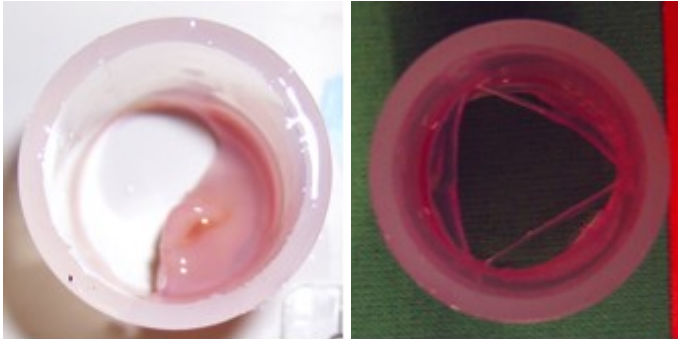


Abbildung 6.7: Erprobung unterschiedlicher Befestigungsmöglichkeiten. Abbildung (a) zeigt die extreme Schrumpfung des Gewebes ohne Befestigung. Bei Befestigung mit Hilfe von Einzelknopfnähten oder Dacronstreifen bot sich ein ähnliches Bild (b + c). Wurden die Klappen am proximalen und distalen Ende mit einem Streifen einer PVDF-Textilstruktur befestigt (d), so konnte der Schrumpfprozeß eingedämmt werden.

6 Ergebnisse

konnte bei ausgedünnten und unter Spannung stehenden Segeln nicht mehr suffizient schließen. Die Segel wiesen einige Einrisse unterhalb des freien Randes auf.



(a) Keine Druckdifferenz

(b) Druckdifferenz 2 cm Wassersäule

Abbildung 6.8: Erprobung diastolischer Lasten von 0 cm H₂O (a) und 2 cm H₂O (b): Makroskopie. Ohne diastolische Last auf den Klappensegeln (a) schrumpfte das tissue-engineerte Gewebe stark. Durch Anlegen einer diastolischen Last von 2 cm H₂O konnte dies vermindert werden.

Mikroskopisch zeigte sich in der trichromgefärbten Übersichtsvergrößerung bei Kultur ohne diastolische Last eine Ausrichtung der Zellen entlang der Gefäßwand im Sinne einer beginnenden Gewebsentwicklung. Eine Produktion extrazellulärer Matrixproteine konnte nicht nachgewiesen werden. In der HE-Färbung kamen langgestreckte, in das Fibringel integrierte Zellen zur Ansicht.

Bei Anlegen von 2 cm H₂O als diastolische Last konnte nach 12 Tagen Kultur ein dichter Gewebeverband mit der Bildung extrazellulärer Matrixproteine, die sich in der Trichromfärbung blau darstellen, nachgewiesen werden. In der HE-Färbung waren dicht gelagerte, langgestreckte und gut in das Gel eingebaute Zellen sichtbar.

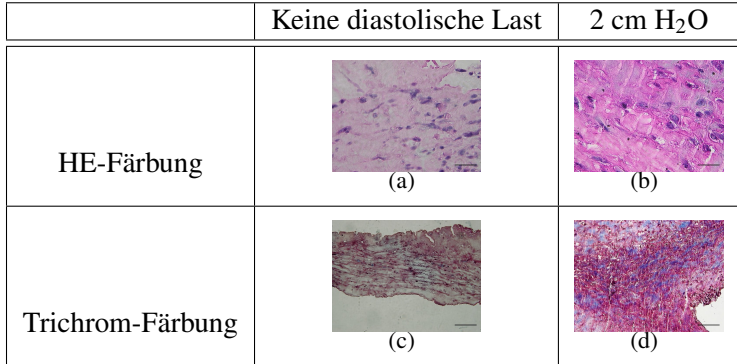


Abbildung 6.9: Erprobung diastolischer Lasten von 0 cm H₂O (a + c) und 2 cm H₂O (b + d): HE-Färbung (a + b) und Trichrom-Färbung (c + d). Bei Aufbringen einer diastolischen Last auf die Klappensegel erhöhte sich die Produktion extrazellulärer Matrixproteine (c + d). Maßstab: Balkenlänge a+b 37,5 μ m, c+d 150 μ m.

6.6 Auswirkungen unterschiedlicher Fibrinogenkonzentrationen auf die Gewebeerwicklung

Um eine Möglichkeit zu finden, die Insuffizienzentwicklung der Klappen zu unterbinden, wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Fibrinogenkonzentrationen durchgeführt. Die Fibrinogenkonzentration betrug 5, 10 und 20 Milligramm Fibrinogen pro Milliliter Gel. Das Fibrinogen für diese Versuche wurde aus Schweineblut isoliert. In diese Klappen wurden 10 Millionen Myofibroblasten pro Milliliter Gel eingegossen. Die Klappen wurden zwölf Tage im Bioreaktorsystem mit einer Druckdifferenz von 2 cmH₂O über die Klappe bei einer Pulsfrequenz von zunächst 5 Schlägen pro Minute und 10 Schlägen pro Minute ab dem sechsten Tag kultiviert. Die Klappen wurden, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, mit Hilfe einer PVDF-Textilstruktur am Silikonmantel

6 Ergebnisse

befestigt.

Makroskopisch zeigte sich bei allen drei Ansätzen eine vollständige Insuffizienz der Klappe nach 12 Tagen Kulturdauer (vgl. Abbildung 6.10, a - c). Die Klappensegel schrumpften bei allen Ansätzen soweit, dass die freien Ränder der Segel stark unter Spannung standen und keinen Schluss mehr zuließen. Das Gefäßstück hat sich bei einer Fibrinogenkonzentration von 5 Milligramm Fibrinogen pro Milliliter Gel in der Mitte ein wenig vom Silikonmantel abgehoben, bei beiden anderen Ansätzen lag die Gefäßwand dem Silikon direkt an. Bei der histologischen Auswertung fiel mit Erhöhung der Fibrinogenkonzentration eine Verminderung der Produktion extrazellulärer Matrixproteine auf (vgl. Abbildung 6.10, d - f).

6.7 Gewebeentwicklung unter optimierten Bedingungen

Die Gewebeentwicklung tissue-engineerter Semilunarklappen unter den im Rahmen dieser Arbeit als optimal herausgearbeiteten Bedingungen wurde über einen Zeitraum von 12 Tagen untersucht und gegen eine „statische Kultur“ im Becherglas mit Rührfisch evaluiert. Dabei wurde das Becherglas mit Rührfisch eingesetzt, um eine erleichterte Stoffdiffusion und einen erleichterten Gasaustausch zwischen Gewebe und Nährmedium zu erlauben.

Dazu wurden Klappen mit einer Fibrinogenkonzentration von 5 Milligramm Fibrinogen pro Milliliter Gel mit 10 Millionen Zellen pro Milliliter Gel gegossen und mit Hilfe einer grobmaschigen PVDF-Textilstruktur am Silikonmantel befestigt. Im Bioreaktor wurden sie dann mit einer Frequenz von 5 Schlägen pro Minute und einer Frequenz von 10 Schlägen pro Minute ab dem sechsten Tag bei einer Druckdifferenz von

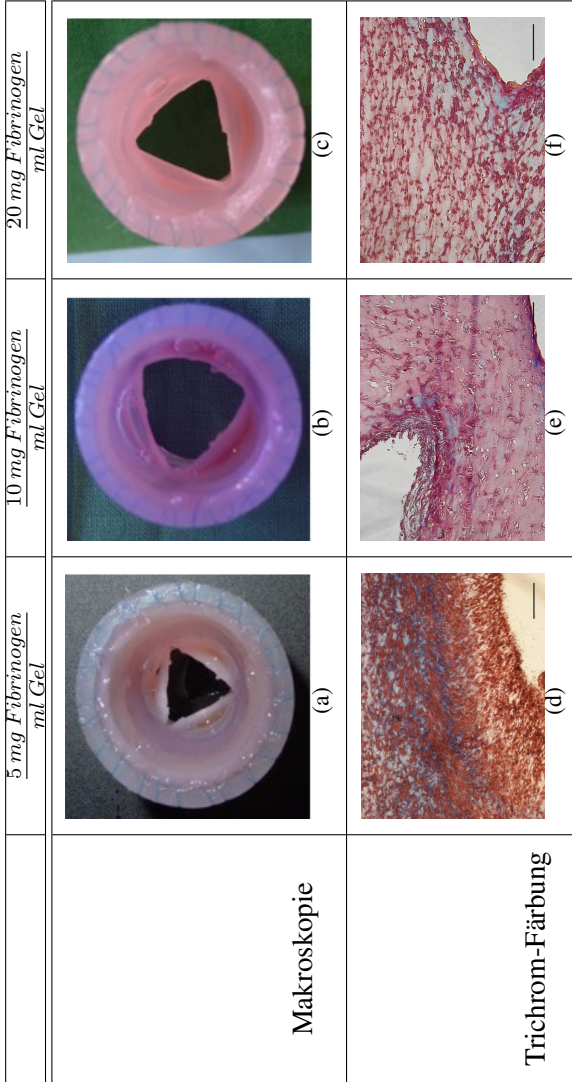


Abbildung 6.10: Auswirkungen unterschiedlicher Fibrinogenkonzentrationen: Makroskopie (a - c) und Trichromfärbung histologischer Schnitte (d - f). Makroskopisch sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den Ansätzen zu erkennen. Auf histologischer Ebene fiel mit Erhöhung der Fibrinogenkonzentration eine verminderte Produktion extrazellulärer Matrixproteine auf (d - f). Maßstab: Balkenlänge d-f 150 μm .

6 Ergebnisse

2 cmH₂O kultiviert. Es wurden zwei Versuchsläufe mit einer Dauer von 12 Tagen durchgeführt.

Zur Auswertung wurden Hämalaun-Eosin- und Trichrom-gefärbte Präparate hergestellt. Zur genaueren Bewertung der Gewebeentwicklung wurden immunhistochemische Färbungen auf Kollagen I, III und V, Poly-4-Hydroxylase, Elastin, Fibronectin, Laminin, Chondroitinsulfat, Alpha-Smooth-Muscle-Actin (α -SMC), Vimentin, von Willebrand Faktor und Fibrinogen vorgenommen.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde die Qualität des Mediums mit Hilfe täglicher Blutgasanalysen hinsichtlich pH, Glucose und Lactat überwacht.

6.7.1 Qualität des Mediums

Die Blutgasanalysen zur Überwachung der Qualität des Mediums (vgl. Abbildung 6.11) ergaben konstant physiologische Werte für pO₂, pCO₂ und pH über die gesamte Kulturdauer. Im Verlauf der Versuche wurden abnehmende Glucosekonzentrationen festgestellt, die aber durch regelmäßigen Austausch des Kulturmediums auf ausreichend hohem Niveau gehalten werden konnten. Niedrige Lactatkonzentrationen im Reaktormedium im Bereich von 1,5 bis 2,5 mmol/L wiesen auf die Aufrechterhaltung aerober Stoffwechselbedingungen hin.

6.7.2 Makroskopischer Aspekt

Die unter „gerührten“ Bedingungen kultivierten Klappen zeigten eine ausgeprägte Schrumpfungstendenz mit deutlichem Formverlust.

Die im Bioreaktorsystem kultivierten Klappen schrumpften zwar auch, jedoch unter Wahrung der Formgebung und Entwicklung einer nur geringen Insuffizienz (vgl. Abbildung 6.12). Das Gewebe stellte sich als

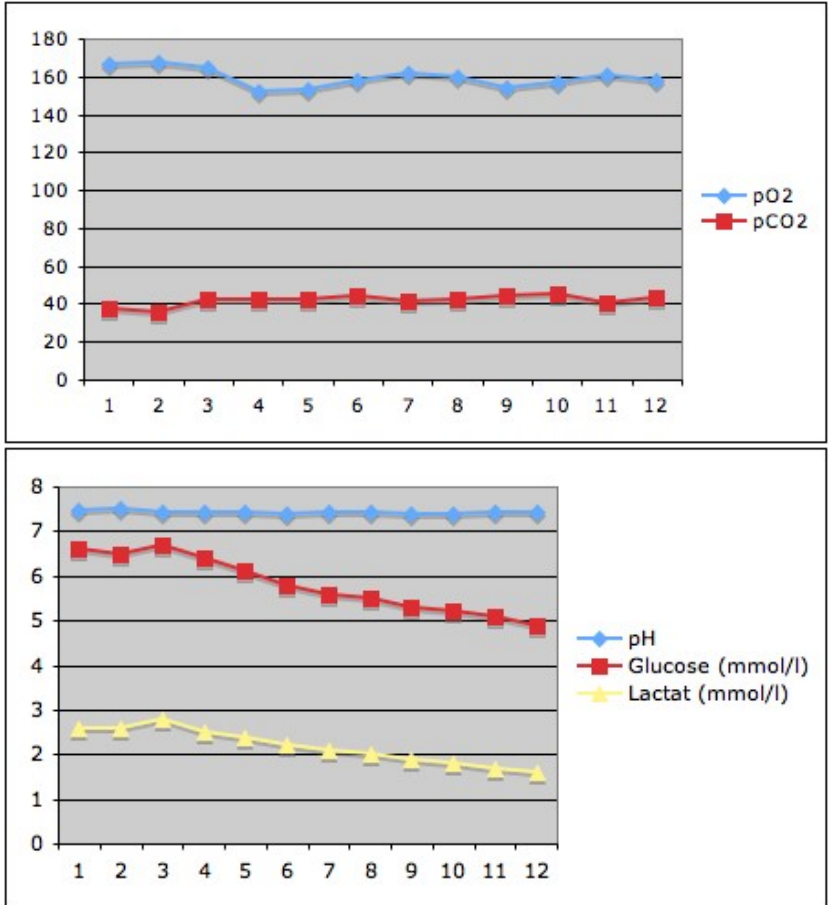


Abbildung 6.11: Blutgasanalysen des Kulturmediums
 X-Achse: Kulturdauer in Tagen, pO₂ und pCO₂ in mmHg, Glucose und Lactat in mmol/L

6 Ergebnisse

elastisch und widerstandsfähig dar; vorsichtige mechanische Manipulationen wurden gut toleriert.

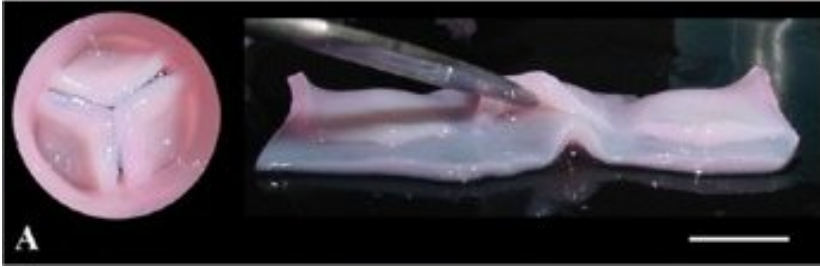


Abbildung 6.12: Tissue-engineerte Klappe nach 12 Tagen Kultur im Bioreaktorsystem - Makroskopie. Maßstab: Balkenlänge 9,5 mm.

6.7.3 Konventionelle Histologie

Unter den in dieser Arbeit als optimal herausgearbeiteten Bedingungen konnte nach 12 Tagen Kultur im Bioreaktorsystem eine ausgeprägte Gewebeentwicklung im Sinne einer Vernetzung der länglich ausgezogenen Zellen und einer Produktion extrazellulärer Matrixproteine nachgewiesen werden. Abgekugelte, von Höfen umgebene Zellen oder andere Anzeichen nekrotischer Zellen waren nicht sichtbar.

Im Gegensatz dazu zeigten die statischen Kulturen eine geringere Zelldichte ohne Integration der Zellen in das umgebende Gewebe mit lacunärer Abkapselung der Zellen. Demnach befanden sich die Zellen in statisch kultivierten Klappen nach 12 Tagen in einem inaktiven Zustand, möglicherweise am Beginn des Zellunterganges.

Im Bioreaktor kultivierte Klappen wiesen eine beginnende Schichtung des Gewebes auf: sie zeigten im Klappensegel, den Außenflächen zugewandt, ein dichter entwickeltes Netzwerk extrazellulärer Matrixproteine als in der Mitte des Segels, annähernd vergleichbar mit der Ge-
122

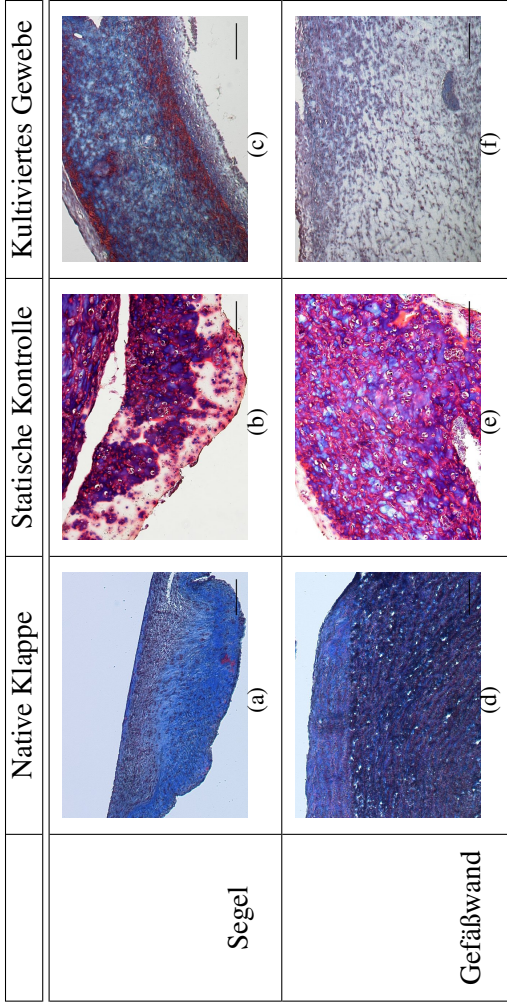


Abbildung 6.13: Trichromfärbungen von Anteilen des Klappensegels (a - c) und der Wand des Pulmonalarterienstammes (d - f) einer nativen ovinen Aortenklappe (a + d), einer statisch kultivierten, tissue-engineerten Klappe (b + e) und einer tissue-engineerten Klappe nach zwölfjähriger Kultur im Bioreaktorsystem (c + f). Die im Bioreaktorsystem kultivierte Semilunarklappe (c + f) läßt ein vernetztes, geschichtetes Gewebe, annähernd vergleichbar mit dem Gewebe einer nativen Semilunarklappe (a + d) erkennen. In der statischen Kontrolle (b + e) war die Produktion extrazellulärer Matrixproteine und deren Organisationsgrad geringer. Maßstab: Balkenlänge 150 μm .

6 Ergebnisse

webeschichtung in nativen Klappensegeln. Auch in der Wand des Pulmonalarterienstammes konnten Zonen verstärkter Gewebeentwicklung nachgewiesen werden, hier insbesondere am Übergang zum Klappensegel. Die statischen Kontrollen wiesen eine deutlich geringer ausgeprägte Synthese extrazellulärer Matrixproteine bei fehlender Schichtenbildung innerhalb des Gewebes auf.

6.7.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Analyse zelltypischer Marker (vgl. Abbildung 6.14, A - F) bewies durch die vergleichbare Expression von Vimentin sowohl der Zellen im nativen Gewebe als auch in beiden Kultursätzen die mesenchymale Herkunft der in das Gewebe eingebrachten Zellen. Alpha-Smooth-Muscle-Actin (α -SMC) wurde allerdings im Gegensatz zur nativen Klappe (vgl. Abbildung 6.14, G und H) in den meisten Zellen der im Bioreaktorsystem kultivierten Klappen (vgl. Abbildung 6.14, K und L) nachgewiesen und zu einem geringeren Anteil auch in den Zellen der statischen Kontrolle (vgl. Abbildung 6.14, I und J). Auf der nativen Klappe konnte durch die Färbung gegen von Willebrand-Faktor (vgl. Abbildung 6.15, M und N) eine konfluente Endothelzellschicht auf der Klappe und der Gefäßwand nachgewiesen werden; ein entsprechendes Signal fehlt auf beiden tissue-engineerten Klappen (vgl. Abbildung 6.15, O - R).

Das Scaffoldprotein Fibrinogen war im nativen Gewebe (vgl. Abbildung 6.15, S und T) nicht nachzuweisen, wogegen es in den tissue-engineerten Geweben als einer der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix auffiel. Dabei zeigte das im Bioreaktor kultivierte Gewebe (vgl. Abbildung 6.15, W und X) ein im Gegensatz zur statischen Kultur (vgl. Abbildung 6.15, U und V) eher fleckiges Färbemuster mit deutlichem Rückgang des Fibrinogenanteils.

Bei der Analyse der Hauptbestandteile extrazellulärer Matrixproteine – den Kollagenen – kam in allen Gruppen eine vergleichbare Expression von Poly-4-Hydroxylase (vgl. Abbildung 6.16, A - F), einem für die Stabilisierung der Kollagen-Tripelhelix essentiellen Enzyms, zur Darstellung. Dagegen wies die Verteilung der Kollagene I und III wesentliche Unterschiede zwischen den im Bioreaktor kultivierten Klappen und den statischen Kontrollen auf. In statischen Kontrollen (vgl. Abbildung 6.16, I und J sowie Abbildung 6.17, O und P) konnte keines der Kollagene nachgewiesen werden, wogegen sie im nativen Gewebe und bei Kultur im Bioreaktor ubiquitär nachgewiesen werden konnten (vgl. Abbildung 6.16, G, H, K, L sowie Abbildung 6.17, M, N, Q, R). Auch die in nativen Klappen nachweisbare Schichtung der Kollagene war erkennbar. Kollagen V war, wie im nativen Gewebe, in beiden Ansätzen nicht nachweisbar (vgl. Abbildung 6.17, S -X).

Elastin, das als extrazelluläres Funktionsprotein der nativen Klappe (vgl. Abbildung 6.18, A und B) Widerstandsfähigkeit gegen Dehnung und Scherkräfte verleiht, kam in den tissue-engineerten Geweben nicht zur Darstellung (vgl. Abbildung 6.18, C - F). Die valvulären Glykoproteine Laminin und Fibronectin zeigten in Geweben aus dem Bioreaktorsystem (vgl. Abbildung 6.18, K + L und Abbildung 6.19 Q + R) und aus den statischen Kontrollen (vgl. Abbildung 6.18, I + J und Abbildung 6.19 O + P) eine höhere Dichte als in den nativen ovinen Aortenklappen (vgl. Abbildung 6.18, G und H sowie Abbildung 6.19 M und N). In beiden Gruppen war die Verteilung zellgebunden.

Das Protein Chondroitinsulfat, das als „Stoßdämpfer“ während des Klappenschlusses die mechanischen Belastungen der Klappensegel abfängt, hatte in tissue-engineerten Geweben, die im Bioreaktorsystem kultiviert wurden (vgl. Abbildung 6.19, W und X), eine annähernd physiologische, gleichmäßige Verteilung (vgl. Abbildung 6.19, S und T). Demgegenüber war die Verteilung in der statisch kultivierten Kontrollgruppe

6 Ergebnisse

stark zellgebunden (vgl. Abbildung 6.19, U und V).

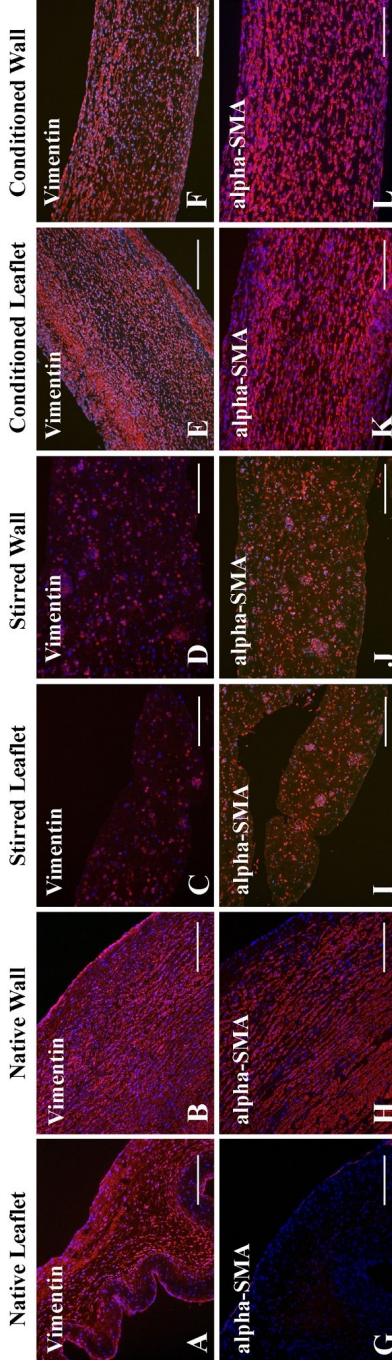


Abbildung 6.14: Immunhistochemische Färbungen für Vimentin (A - F) und glattes Muskelaktin (G - L). Sowohl im nativen Gewebe als auch in beiden Kulturanisätzen exprimierten die Zellen Vimentin (A - F). Glattes Muskelaktin wurde, im Gegensatz zur nativen Klappe (G + H), in den meisten Zellen der im Bioreaktorsystem kultivierten Klappen (K + L) nachgewiesen und zu einem geringeren Anteil in den Zellen der statischen Kontrolle (I + J). Maßstab: Balkenlänge 250 μm .

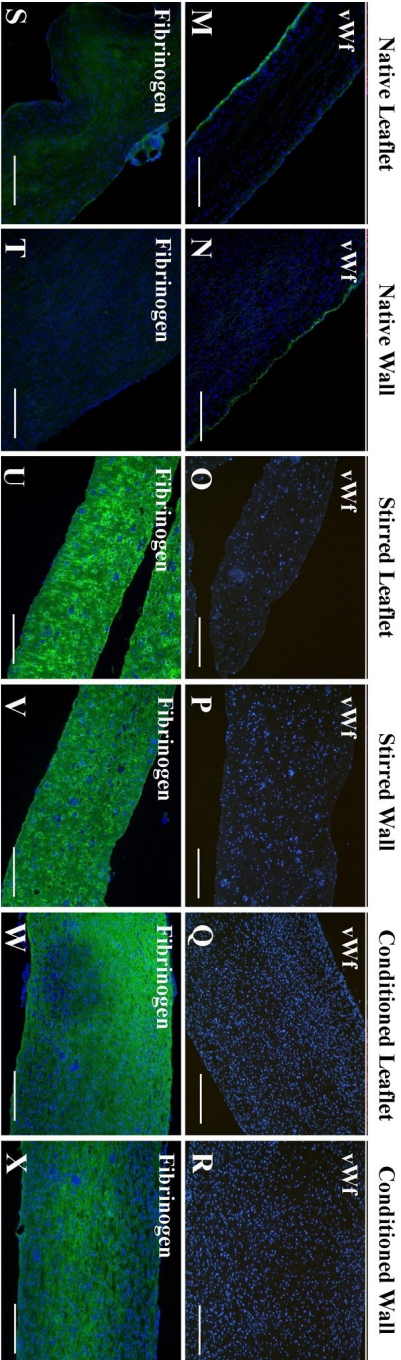


Abbildung 6.15: Immunohistochemische Färbungen für von Willebrand-Faktor (M - R) und Fibrinogen (S - X). Auf der nativen Klappe konnte die Färbung gegen von Willebrand-Faktor (M + N) eine konfluente Endothelzellschicht auf der Klappe und der Gefäßwand nachweisen; ein entsprechendes Signal fehlte auf beiden tissue-engineerten Klappen (O - R). Fibrinogen war im nativen Gewebe (S + T) nicht darstellbar, wogegen es in den tissue-engineerten Geweben als einer der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix auffiel (U - X). Maßstab: Balkenlänge 250 μm .

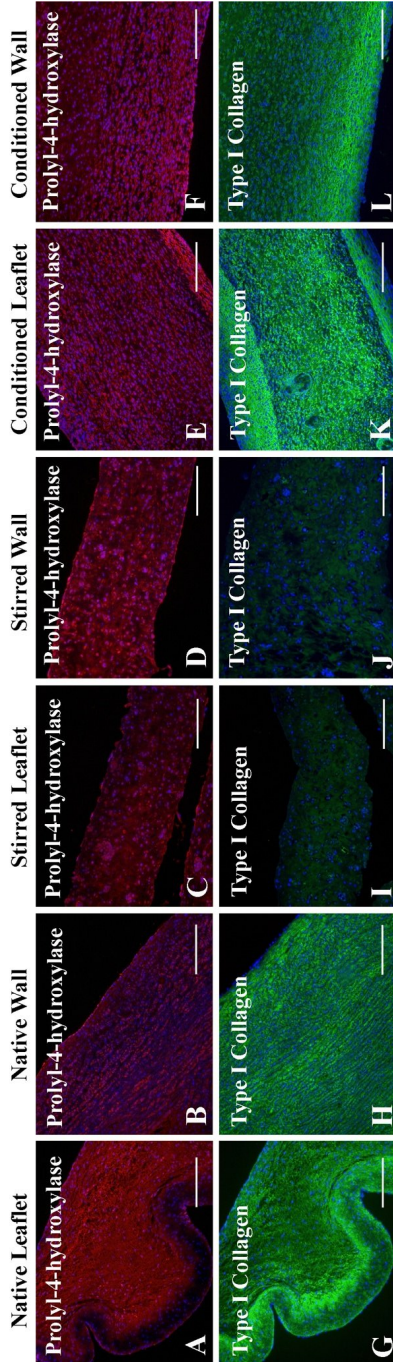


Abbildung 6.16: Immunhistochemische Färbungen für Poly-4-Hydroxylase (A - F) und Kollagen I (G - L). In allen Gruppen kam eine vergleichbare Expression von Poly-4-Hydroxylase (A - F) zur Darstellung. In der statischen Kontrolle konnten Kollagen I und III nicht nachgewiesen werden (I, J, Abb. 6.17 O, P). In den nativen ovinen Aortenklappen (G, H, Abb. 6.17 M, N) und den im Bioreaktor kultivierten Klappen (K, L, Abb. 6.17 Q, R) fiel eine ubiquitäre Verteilung von Kollagen I und III auf. Maßstab: Balkenlänge 250 μm .

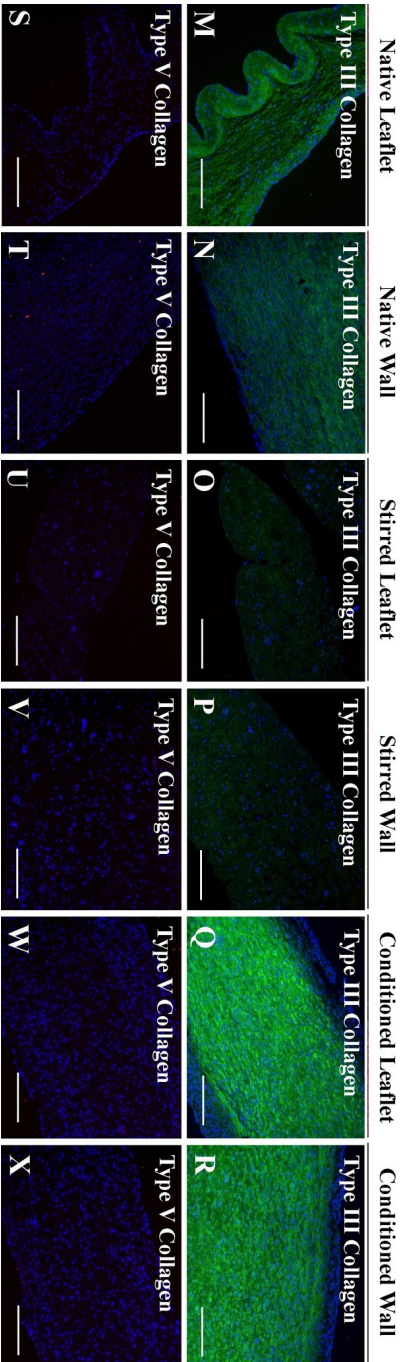


Abbildung 6.17: Immunhistochemische Färbungen für Kollagen III (M - R) und Kollagen V (S - X). In der statischen Kontrolle konnten Kollagen I und III nicht nachgewiesen werden (I, J, O, P). In den nativen ovinen Aortenklappen (G, H, M, N) und den im Bioreaktor kultivierten Klappen (K, L, Q, R) fiel eine ubiquitäre Verteilung von Kollagen I und III auf. Kollagen V zeigte in allen Gruppen kein Signal (S - X). Maßstab: Balkenlänge 250 μm .

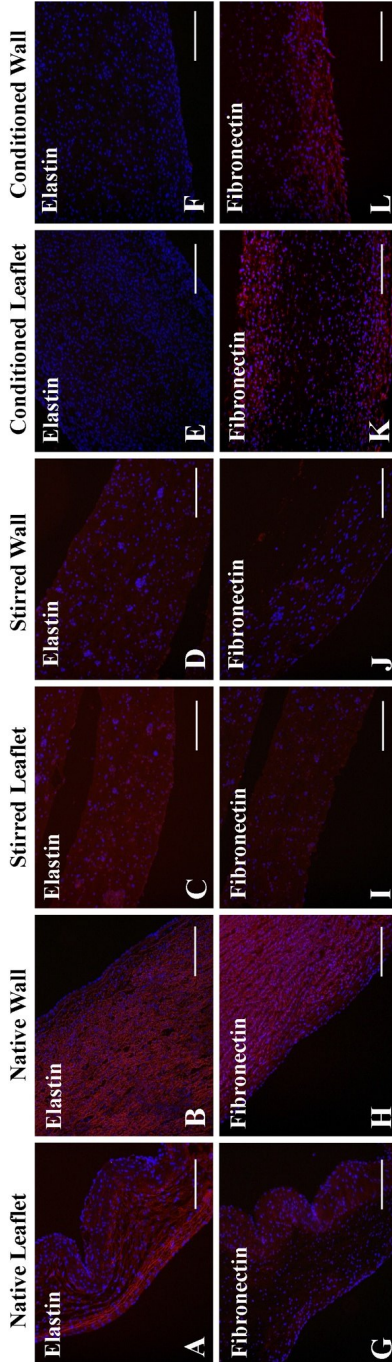


Abbildung 6.18: Immunohistochemische Färbungen für Elastin (A - F) und Fibronectin (G - L). Elastin, ein extrazelluläres Funktionsprotein der nativen Klappe (A und B), kam in den tissue-engineierten Geweben nicht zur Darstellung (C - F). Das valvuläre Glykoprotein Fibronectin zeigte in Geweben aus dem Bioreaktorsystem (K + L) eine höhere Dichte als in den statischen Kontrollen (I + J). In beiden Gruppen war die Verteilung Zellgebunden. Maßstab: Balkenlänge 250 μm .

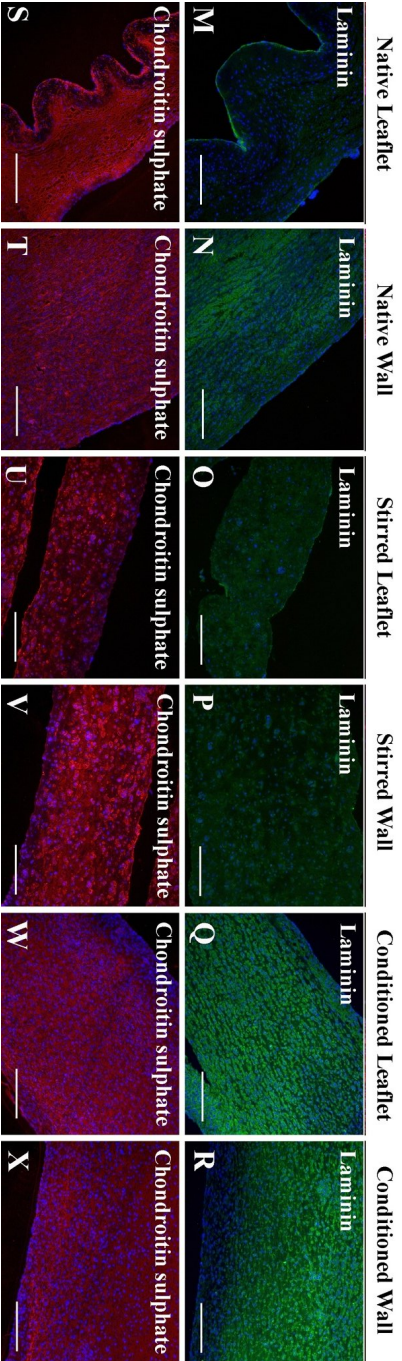


Abbildung 6.19: Immunhistochemische Färbungen für Lamminin (M - R) und Chondroitinsulfat (S - X). Das valvuläre Glykoprotein Fibronektin zeigten in Geweben aus dem Bioreaktorsystem (Q + R) eine höhere Dichte als in den statischen Kontrollen (O + P). In beiden Gruppen war die Verteilung zellgebunden. Chondroitinsulfat wies in tissue-engingierten Geweben, die im Bioreaktorsystem kultiviert wurden (W + X), eine annähernd physiologische, gleichmäßige Verteilung (S + T) auf. Demgegenüber war die Verteilung in der statisch kultivierten Kontrollgruppe stark zellgebunden (U + V). Maßstab: Balkenlänge 250 μm .

7 Diskussion

7.1 Weiterentwicklung des Gußverfahrens

Jockenhövel et al. konnten bereits zeigen, dass es mit Hilfe eines Spritzgussverfahrens grundsätzlich möglich ist, die komplexe Form einer Herzklappe nachzubilden [42]. Ziel der Weiterentwicklung des Gussverfahrens im Rahmen dieser Arbeit war es, diese Möglichkeit für das valvuläre Tissue Engineering nutzbar zu machen.

Da Fibringel den Belastungen einer direkten Implantation nicht standhält, musste eine Möglichkeit gefunden werden, den Scaffold in einem Bioreaktorsystem zu befestigen und zu konditionieren. Der Einbau der Scaffolds in die in der Literatur beschriebenen Bioreaktorsysteme Dumonts und Hoerstrups (vgl. Kapitel 3.4.3.5, [36], [19]) erfolgt mittels chirurgischer Nähte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein alternatives Befestigungsverfahren entwickelt, um die mit der Naht einhergehenden Traumatisierungen am Fibringel zu vermeiden. Durch den Guss des Scaffolds direkt in einen Silikonmantel wird die Notwendigkeit der direkten manuellen Manipulation am Scaffold minimiert. Dadurch wird das Risiko von Schäden am Scaffold gegenüber einer Befestigung durch Nahtmaterial verkleinert und die Sicherheit des Verfahrens erhöht.

Die ausschließliche Befestigung durch Haftung des Gels musste jedoch im Laufe der durchgeführten Versuche verlassen werden, da sie nicht

7 Diskussion

ausreichte, um der Schrumpfungstendenz des Gewebes entgegenzuwirken. Das entwickelte Befestigungsverfahren mit Hilfe zweier Ringe aus einer grobmaschigen Textilstruktur, die bereits vor dem Guss am Silikonmantel festgenäht werden, ermöglicht durch den Einbau des Gels in die Poren der Textilstruktur einen festen Halt des Scaffolds im Silikonmantel. Erst dadurch wird die Erhaltung einer physiologischen Form des sich entwickelnden Gewebes möglich, da ohne diese zusätzliche Befestigung die Klappenform nach kurzer Kulturdauer nicht mehr erhalten werden kann [vgl. Kapitel 6.4]. Diese Art der Befestigung gibt dem Scaffold besseren Halt als Nähte und erhält andererseits den Vorteil des reduzierten Kontaktes zum Scaffold. Außerdem diente sie während erster tierexperimenteller Studien als idealer Nahtring.

Die bisher beschriebenen Änderungen des Gussverfahrens dienen dazu, Fibringel als Scaffold handhabbar für weitere Kulturprozesse zu machen. Die nachfolgend aufgeführten Entwicklungen wurden zum einen getätigt, um die Notwendigkeit von Manipulationen am Scaffold noch weiter zu reduzieren, und zum anderen, um der durch den Schrumpfungsprozess erzeugten Veränderung der Geometrie der tissue-engineerten Klappe entgegenzuwirken.

In Version I und II der Gussstempel besteht die Notwendigkeit, beim gegossenen Scaffold eine Kommissurotomie vorzunehmen, also die einzelnen Segel mit Hilfe eines Skalpellts voneinander zu trennen, da sie gleichsam "am Stück" gegossen werden. Um dies zu umgehen, wurden die folgenden Versionen der Gussstempel so entworfen, dass ein Steg vom einen Stempel zum anderen die Segel direkt beim Guss voneinander trennt. Dadurch konnte die Gefahr von Beschädigungen am Scaffold weiter reduziert und die Verlässlichkeit des Gussprozesses erhöht werden.

Die Version II der Gussstempel beinhaltet außerdem die Erhöhung der Klappensegeloberfläche im Vergleich zur nativen Pulmonalklappe. Da-

134

durch sollte die während der Kultur im Bioreaktorsystem auftretende Schrumpfung der Segel – bis hin zur Insuffizienz – vorweggenommen werden, indem zunächst mehr Gewebe zur Verfügung steht als eigentlich benötigt. Dieses Ziel konnte aber durch die oben beschriebene Modifikation nicht erreicht werden. Insbesondere durch die Schrumpfung im Bereich des freien Randes des Segels entwickelte sich weiterhin eine Insuffizienz der Klappe (vgl. Kapitel 6.7).

Da in Version II der Gussstempel die Segeloberfläche auf Kosten des freien Randes erhöht wurde und nun insbesondere in diesem Bereich eine Schrumpfung zu beobachten war, erfolgte mit Version III der Gussform eine Verlängerung des freien Randes und eine Vergrößerung der Fläche, auf der die Segel beim Klappenschluss aneinanderliegen. Diese Vergrößerung war jedoch so stark, dass die Klappe nicht mehr ohne Beschädigung aus der Gussform entfernt werden konnte.

In Version IV der Gussstempel wurde der freie Rand etwas weniger gegenüber der nativen Klappe vergrößert als in Version III. Die Dicke der Klappensegel wurde von 1 auf 2 Millimeter erhöht, um diese stabil genug für die Entfernung aus der Gussform zu gestalten. Dieses Ziel konnte erreicht werden: eine Entformung aus der Gussform ist in Version IV problemlos möglich, und die direkte Trennung der Klappensegel durch Stege in der Gussform verhindert die bei Version I und II auftretenden Beschädigungen durch die Kommissurotomie.

Zusammenfassend konnten durch die beschriebenen Weiterentwicklungen des Spritzgussverfahrens fibringelbasierte Scaffolds für das valvuläre Tissue Engineering nutzbar gemacht werden. Durch die Möglichkeit, den Einbau in das Bioreaktorsystem ohne direkten Kontakt zum Scaffold durchzuführen und die Segel direkt voneinander getrennt zu gießen, wird die Gefahr, den Scaffold nach Guss zu beschädigen, soweit wie möglich reduziert. Der Versuch, den Schrumpfungsprozess durch eine Anpassung der Geometrie der Klappensegel durch Vergrö-

7 Diskussion

berung bereits vorwegzunehmen, wurde in Version II der Gussstempel von Mißerfolg begleitet: es kam weiterhin zur Entwicklung insuffizienter Klappen. Die Geometrie der Gußform wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter entwickelt, um diesem Problem zu begegnen, jedoch konnte noch keine systematische Evaluation dieser Entwicklung durchgeführt werden.

Synthetische Polymere und decellularisierte Klappen besitzen im Bereich der Formgebung ihre eigenen Besonderheiten. Decellularisierte Klappen haben, wie in Kapitel 3.4.2.1 ausgeführt, entsprechend ihrer Herkunft bereits eine den nativen Herzklappen entsprechende Geometrie. Jedoch kommt es auch hier im Verlauf der Gewebsentwicklung zu Veränderungen der Geometrie, die jedoch deutlich langsamer zutage traten, als in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen. Dies ist begründet in einer im Vergleich zu den Versuchen dieser Arbeit mindestens um den Faktor 10 geringeren Zellbesiedlungsdichte, wie zum Beispiel in der Arbeit von Zeltinger et al. [106], die zu einem deutlich langsameren Gewebeumbau führt. Solche Veränderungen können entsprechend der Herkunft des Scaffolds nicht durch Änderungen der Formgebung im Vorhinein ausgeglichen werden, wodurch der wesentliche Vorteil der decellularisierten Klappen bei der Formgebung in Frage gestellt wird.

Synthetische Polymere sind im Bereich der Formgebung ähnlichen Problemen wie das Fibringel ausgesetzt (vg. 3.4.2.2). Die höhere Formstabilität läßt Veränderungen der Geometrie weniger leicht zu, wobei auch bei diesem Scaffoldmaterial zur Besiedlung wie zum Beispiel in den Arbeiten von Hoerstrup et al. [35] um den Faktor 10 niedrigere Zellzahlen genutzt wurden. Allerdings sind die Schwierigkeiten im Bereich der Formgebung bei der Nutzung synthetischer Polymere nicht vernachlässigbar, auch wenn die von Sodian et al. [88] vorgestellte Methode zur Formgebung mittels Lithographie einen gangbaren – aber aufwändigen

– Weg darstellt.

Ein weiterer gemeinsamer Nachteil der synthetischen Polymere und der decellularisierten Klappen gegenüber autologen biologischen Matrices ist noch herauszuarbeiten: Um die Implantation von Fremdmaterial, welches im Körper Entzündungsreaktionen auslöst, zu vermeiden, sind lange Kulturdauern von bis zu zwei Jahren notwendig, da der Abbau dieser Materialien nicht gut kontrolliert werden kann und einen langen Zeitraum benötigt (vgl. Kapitel 3.4.2.2 und 3.4.2.1). Dabei verlieren synthetische Polymere ihre mechanischen Eigenschaften durch Degradation in einem kurzen Zeitraum von 2-12 Wochen entsprechend den Eigenschaften des jeweiligen Materials. Die degradierten Polymere verbleiben jedoch im Gewebe und benötigen einen langen Zeitraum, um ausgewaschen zu werden. Bei decellularisierten Matrices ist der Abbau im menschlichen Körper durch Proteasen vermittelt. In welchem Ausmaß diese in tissue-engineertem Gewebe vorhanden sind, muss jedoch in Frage gestellt werden.

Fibringel, welches als autologes Material nicht in vergleichbarem Maße entzündungsfördernd ist, degradiert ohne Proteaseinhibitor im Kulturmedium innerhalb weniger Tage und kann schnell resorbiert werden. Durch den Zusatz eines Proteaseinhibitors kann der Abbau kontrolliert werden [105], so dass auch längere Kulturdauern im Bioreaktorsystem möglich werden. Im Gegensatz zu synthetischen Polymeren entspricht hier die Elimination aus dem Gewebe auch weitgehend dem Verlust der mechanischen Eigenschaften.

Fibringel hat im Bereich der Degradation insgesamt ideale Eigenschaften für ein Scaffold und ist durch die Technik des Spritzgusses zur Herstellung komplexer Geometrien gut geeignet. Die Herausforderungen bei seinem Einsatz liegen im Bereich der mechanischen Stabilität und der Formstabilität.

7.2 Bioreaktorentwicklung

Die Beurteilung des entwickelten Bioreaktorsystems soll zum einen im Vergleich zu den beschriebenen Systemen der Arbeitsgruppen Hoerstrup [36] und Dumont [19] (vgl. Kapitel 3.4.3.5), zum anderen vor dem Hintergrund der von Freed [25] beschriebenen Anforderungen (vgl. Kapitel 3.4.3.2) an ein Bioreaktorsystem erfolgen. Mindestens eine von folgenden Funktionen sollte ein Bioreaktor demnach zur Verfügung stellen können:

1. Eine gleichmäßige Verteilung von Zellen in einem dreidimensionalen Scaffold sicherstellen.
2. Die gewünschte Konzentration von Gasen und Nährstoffen im Kulturmedium aufrechterhalten.
3. Dem sich entwickelnden Gewebe einen ausreichenden Massentransport zur Nährstoffversorgung zur Verfügung stellen.
4. Das wachsende Gewebe physikalischen Stimuli aussetzen.
5. Informationen über die Gewebeentwicklung liefern.

Um diese von der eigentlichen Bioreaktorentwicklung abstrahierten Aufgaben in einen Designprozess einfließen zu lassen, wurden diese Anforderungen in Form von Zielsetzungen für das Design konkretisiert (vgl. Kapitel 4.3.1):

- Variabilität von Frequenz und Schlagvolumen
- Keine diastolische Last auf den Klappensegeln
- Anpassbare Windkesselfunktion

- Von Frequenz und Schlagvolumen unabhängiger Gasaustausch
- Transparenz des Kulturprozesses
- Schonender Transfer der Klappe in das Reaktorsystem
- Einfache Handhabung.

Die in weiten Grenzen modifizierbaren Größen Frequenz, Schlagvolumen, hydrostatischer Druck und Compliance des Windkessels sollen dabei die Erfüllung der Aufgaben 3 und 4, also Nährstoffversorgung und physikalische Stimuli, sicherstellen. Die im entwickelten System zur Verfügung stehenden Schlagfrequenzen werden nur durch das System zur Erzeugung der pneumatischen Membranauslenkung limitiert. Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Beatmungsgerät Servo 900B/C kann Frequenzen im Bereich von 5 bis 60 Schlägen pro Minute erzeugen; es stehen jedoch auch andere Geräte mit niedrigeren und höheren Frequenzen zur Verfügung. Die mit Hilfe des Servo 900B/C erzeugten Frequenzen entsprechen im oberen Bereich in etwa der Herzfrequenz eines trainierten Erwachsenen (vgl. Kapitel 2.3), im Bereich der niedrigen Frequenzen in etwa denjenigen ganz am Anfang der embryonalen Klappenentwicklung.

Der wesentliche Nachteil der Pneumatik ist die Trägheit eines solchen Systems. Diese wird durch die Kompressibilität der Luft verursacht: soll die Membran ausgelenkt werden, erhöht das Beatmungsgerät zunächst den Druck im pneumatischen System. Dies führt zunächst zur Kompression der Luft und dann zur Membranauslenkung. Dadurch kommt es, verglichen mit einer mechanischen Pulsduplikation, zu einem trägen, schlecht steuerbaren Anstieg des Druckniveaus. Zur exakten Simulation der Druckveränderungen im menschlichen Herzen ist demnach die Verwendung eines mechanischen Pulsduplikators mit genauerer Möglichkeit der Ansteuerung zu erwägen.

7 Diskussion

Vor dem Hintergrund der Arbeiten, die niedrige Scherkräfte am Anfang der Entwicklung tissue-engineerter Herzklappen als vorteilhaft herausstellen (vgl. Kapitel 3.4.3.1), erscheint die Möglichkeit, sowohl niedrige Schlagfrequenzen als auch niedrige Schlagvolumina im Bereich von 5 Millilitern beim hier entwickelten System erzeugen zu können, wichtig. Das maximal erreichbare Schlagvolumen von 25 Millilitern macht es bei der hier verwendeten 1,6-fachen Verkleinerung der Dimensionen der Klappe außerdem möglich, Klappen auch unter annähernd physiologischen Bedingungen eines Erwachsenen konditionieren und testen zu können. Vor diesem Hintergrund ist auch die Möglichkeit zu sehen, beliebige sterile Reservoirs oder auch nur Gasfilter als Windkessel anzuschließen, um so die Complianceverhältnisse in verschiedenen menschlichen Entwicklungsphasen nachbilden zu können.

Die in der ersten Version des Bioreaktors fehlende Möglichkeit, eine diastolische Last auf die Klappensegel auszuüben, beruhte auf dem Gedanken, fetale Bedingungen bei der Entwicklung der Klappe nachstellen zu wollen, denn im menschlichen Körper findet die Klappenentwicklung ohne Last statt (vgl. 2.1). Im Verlaufe dieser Arbeit erwuchs jedoch der Wunsch, variable Lasten auf die Klappe erzeugen zu können, weshalb der Bioreaktor entsprechend modifiziert wurde. In seiner zweiten Version können nun Druckdifferenzen bis 6 cmH₂O während der diastolischen Phase durch Aufbringen einer Wassersäule auf die Klappe erzeugt werden, die den Bedingungen an der Pulmonalklappe eines Erwachsenen entsprechen.

Es wird also deutlich, dass die Anforderungen an einen ausreichenden Massentransport zur Nährstoffbereitstellung und an die Möglichkeit, physikalische Stimuli auf das Gewebe auszuüben, im Sinne von Freed mit diesem Bioreaktorsystem erfüllt werden. Beide vorherbeschriebenen Systeme arbeiten ebenfalls nach dem System des pneumatischen Pulsduplikators und können diese Anforderungen ebenfalls erfüllen. Auch

wenn Dumont et al. ihr System aufgrund publizierter Druckkurven [19] im Vorteil gegenüber dem System der Gruppe um Hoerstrup sehen, für das diese Druckkurven nicht zur Verfügung stehen, ist es auch mit dem letztgenannten nach Aussage der Autoren [36] möglich, die physiologischen Druckverhältnisse von Erwachsenen und Kindern an Herzklappen nachzustellen. Dies muss jedoch aufgrund der Konstruktion dieses Bioreaktorsystems in Zweifel gezogen werden, da die Verbindung vom nachgebildeten Ventrikel zur Kulturkammer durch eine wenige Millimeter messende Bohrung geschaffen wird. Aufgrund des hier abfallenden Druckgradienten wird sowohl eine genaue Steuerung des systolischen Druckes als auch der diastolischen Last auf den Klappensegeln erschwert.

Durch eine Bohrung so geringen Ausmaßes entsteht außerdem ein Düseneffekt mit einem zentralen Flüssigkeitsstrahl und seitlich auftretenden Verwirbelungen, durch die keine kontrollierten Scherkräfte auf das sich entwickelnde Gewebe wirken. Kontrolliert wirkende Scherkräfte werden als wesentliche Voraussetzungen einer guten Gewebeentwicklung in tissue-engineerten Geweben diskutiert (vgl. Kapitel 3.4.3.4), so dass das hier vorgestellte Kultursystem in diesem Punkt eine sinnvolle Weiterentwicklung darstellt.

Der Austausch von Gasen ist in den in der Literatur beschriebenen Systemen unbefriedigend gelöst: er erfolgt entweder über das Mediumreservoir mit Hilfe eines Luftfilters oder über gasdurchlässige Schläuche. Dabei wird der Fluss des Mediums ausschließlich durch den Fluss durch die zu kultivierende Klappe definiert. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte System ermöglicht es, den Gasaustausch unabhängig von der Flussrate über die Klappe zu steuern.

Bei sich im Verlaufe der Kultur erhöhenden Anforderungen an den Gasaustausch ist es so möglich, ohne die Belastung auf die Klappe zu verändern, O₂-Versorgung und CO₂-Abtransport anzupassen.

7 Diskussion

Freed [25] formulierte als weitere Anforderung an Bioreaktoren die Möglichkeit, während des Kulturprozesses Informationen über die Entwicklung des Gewebes zu erhalten. In den Systemen nach Hoerstrup und Dumont ist es möglich, durch Sicht auf die sich entwickelnde Struktur Informationen über die makroskopische Entwicklung zu gewinnen. Auch in unserem System ist dies durch den durchsichtigen Werkstoff PMMA (Plexiglas), aus dem der Reaktor gefertigt ist, möglich. So können zwar grobe Fehlentwicklungen der Klappenform während der Kultur erkannt werden, aber die Gewebeentwicklung selber ist auf diese Art und Weise genauso wenig beurteilbar wie die Qualität des Kulturmediums. Im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendbarkeit ist dies unzureichend, da so keine ausreichende Qualitätskontrolle erfolgen kann. Ein erster Schritt einer weitergehenden Qualitätskontrolle ist im Rahmen dieser Arbeit durch die regelmäßige Entnahme von Kulturmedium zur Analyse in einem herkömmlichen Blutgasanalysegerät erreicht worden. Sie liefert jedoch nur punktuell Informationen, so dass rasche Änderungen von Nährstoffbedarf und veränderte Anforderungen an den Gasaustausch nicht erfasst werden können. Dies ist nur durch die Integration einer online-Meßstrecke für grundlegende Parameter der Qualität des Mediums wie pO_2 , pCO_2 und pH adäquat sicherzustellen. Entsprechende Sensoren sind kommerziell verfügbar, und die Integration kann in unserem System beispielsweise im Bereich des Gasaustauschkreislaufes ohne wesentliche Modifikationen erfolgen.

Neben der Möglichkeit, die Qualität des Kulturmediums kontrollieren zu können, ist auch eine über die visuelle Beobachtung hinausgehende Analyse der Gewebeentwicklung notwendig, um eine standardisierte Gewebequalität am Ende des *In-vitro*-Kulturprozesses sicherzustellen. Hier bietet sich die Messung von Markern der Gewebeentwicklung an, die in das Kulturmedium sezerniert werden, und deren Konzentration Rückschlüsse auf die Gewebeentwicklung zuläßt. Für die Produktion von Kollagen wurde die Tauglichkeit dieses Konzeptes durch Messung

des Pro-Kollagen-Peptids III von Jockenhoevel et al. demonstriert [43]. Eine Qualitätskontrolle auf der Ebene der Funktion der Klappen ist durch bildgebende Verfahren wie die Sonographie oder optische Messungen wie die Laserdurchdringung möglich. Auf diese Weise ist eine Beurteilung der Klappenbewegungen und die Erkennung von Insuffizienzen und Stenosen bereits im Bioreaktorsystem möglich, die durch Eingriffe in den Kulturprozeß gegebenenfalls ausgeglichen werden können.

Ein einfacher und schneller Zusammenbau des Bioreaktors ist nicht nur im Hinblick auf die Anwenderfreundlichkeit wichtig, sondern er vermindert die Gefahr mikrobiologischer Kontaminationen und reduziert die Zeitspanne, während derer das Gewebe nicht von Medium umspült ist. Durch das Zusammenstecken von Bauteilen gleichen Durchmessers auf Gewindestangen ist mit dem beschriebenen System ein Aufbau innerhalb weniger Minuten möglich.

Das System nach Hoerstrup und insbesondere der Reaktor der Gruppe um Dumont besteht aus mehreren Bauteilen, die über Schläuche miteinander verbunden werden müssen. Außerdem muss die zu kultivierende Struktur erst in einer Befestigungsvorrichtung eingenäht werden. Dies macht Beschädigungen des Scaffolds und Kontamination des Systems leichter möglich als bei dem hier vorgestellten Bioreaktoraufbau.

Weder das hier vorgestellte noch die in der Literatur beschriebenen Bioreaktorsysteme ermöglichen die Besiedlung eines Scaffolds mit Zellen im Bioreaktor, wie von Freed [25] gefordert. Für die Integration der Myofibroblasten in das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Fibringel spielt diese Begrenzung keine Rolle, da die Myofibroblasten schon bei der Herstellung des Scaffolds in das Gel mit eingegossen werden. Andere Scaffolds müssen jedoch vor Kultur mit Zellen besiedelt werden; hier stellt genau dieser Besiedlungsprozess eine große Herausforderung dar. Insofern ist die fehlende Möglichkeit, eine Zellbesiedlung im ent-

7 Diskussion

wickelten Reaktorsystem vorzunehmen, als grundsätzliche Einschränkung des Anwendungsbereiches anzusehen.

Diese Einschränkung machte es auch nötig, ein System zur Endothelzellbeschichtung der Klappe zu entwickeln. Um auch hier mögliche Beschädigungen und Kontaminationen zu verhindern, wurde die entwickelte Besiedlungskammer genau auf Gussprozess und Bioreaktor zugeschnitten. Die im Silikonmantel aufgehängte Klappe wird von zwei Spangen umschlossen und mit deren Hilfe in die Besiedlungskammer eingesetzt; auch hierbei muss die Klappe nicht berührt werden, und auch dieses System ist in wenigen Minuten zusammensetzen. Die Verwendung einer Rollerpumpe mit schiefer Ebene zur Bewegung der Klappe im dreidimensionalen Raum ist hierbei technisch sehr einfach zu realisieren, insbesondere im Vergleich mit dem von Lueders et al. [57] vorgestellten Verfahren. Dieses Verfahren ermöglicht eine genaue Steuerung der Bewegungen im dreidimensionalen Raum. Jedoch muss in Frage gestellt werden, ob für eine ausreichende Besiedlung mit Endothelzellen ein derart aufwendiges Verfahren notwendig ist, wobei es bisher keine Vergleichsexperimente dynamischer Besiedlungsmethoden gibt.

Zusammenfassend können sowohl das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte als auch die in der Literatur beschriebenen Bioreaktorsysteme grundlegende Anforderungen an einen Bioreaktor im Bereich der Nährstoffversorgung und der mechanischen Stimulation erfüllen. Die Gewährleistung des Gasaustausches ist ebenfalls bei allen Systemen gegeben, auch wenn das hier beschriebene in diesem Bereich eine größere Flexibilität aufweist. Die Unmöglichkeit, Zellbesiedlung im Reaktor vorzunehmen, stellt bei allen Systemen eine Einschränkung der Anwendbarkeit dar, spielt aber durch den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Scaffold Fibringel eine untergeordnete Rolle, wobei die enge Integration von Gussprozess, Bioreaktor und Endothelzellbesiedlung eine vorteilhafte Neuentwicklung darstellt. Informationen über die

Gewebsentwicklung vermögen alle Systeme nur unzureichend zu geben. In Zukunft liegt hier die Notwendigkeit, ein System zur kontinuierlichen Überwachung grundlegender Parameter der Qualität des Mediums, wie pH, pO_2 und pCO_2 , zu entwickeln. Außerdem bietet die Bestimmung von Parametern der Gewebeentwicklung, zum Beispiel der Konzentrationen von Spaltprodukten aus der Synthese extrazellulärer Matrix, die Möglichkeit, die Gewebeentwicklung nicht-invasiv während der Kultur zu erfassen.

7.3 Erarbeitung geeigneter Kulturbedingungen für das vorgestellte Bioreaktorsystem

Neben der Entwicklung eines integrierten Systems für Guss, Kultur und Zellbesiedlung von tissue-engineerten Herzklappen auf Fibrinogelbasis war die Herausarbeitung optimaler Kulturbedingungen im Bioreaktorsystem Ziel dieser Arbeit. Eine geringe Belastung durch Scherkräfte wurde als günstig für die Entwicklung tissue-engineerter cardiovascularer Gewebe beschrieben ([55], [91], [66]). Einige Autoren spekulieren, dass so physiologische Bedingungen der fetalen Entwicklung nachgeahmt werden, die besonders günstig für das Tissue Engineering sein könnten [91]. In der Entwicklung eines optimierten Kulturprotokolles lehnt sich diese Arbeit obiger Ansicht an.

7.3.1 Einfluß der Zusammensetzung des Scaffolds

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Fibrinogenkonzentrationen auf die Gewebeentwicklung zu untersuchen, wurden Klappen mit 5, 10 und 20 Milligramm Fibrinogen pro Milliliter Gel gegossen. Direkt nach Guß waren die gegossenen Strukturen um so stabiler, desto höher die

7 Diskussion

Fibrinogenkonzentration lag. Nach 12 Tagen Kultur konnten keine Unterschiede in der Gewebeentwicklung nachgewiesen werden, weder im Bereich der mechanischen Widerstandsfähigkeit, noch im Bereich der Veränderung der Gewebegeometrie, noch auf histologischer Ebene.

Da Fibrinogen ein grundsätzlich thrombogenes und entzündungsförderndes Protein ist, sollte es bei Implantation möglichst weit abgebaut sein [54]. Dies wird durch eine niedrige Fibrinogenkonzentration beim Guß gefördert. Da Gele mit einer Konzentration vom 5 Milligramm Fibrinogen pro Milliliter Gel problemlos handhabbar sind, erscheint dies nach dieser Versuchsreihe als sinnvolle Fibrinogenkonzentration. Wesentlich vor dem Hintergrund eines kompletten Abbaus der Fibrinogelmatrix vor Implantation ist außerdem die Möglichkeit, den Abbau des Fibringels *in vitro* zu kontrollieren. Ohne Zugabe eines Proteaseinhibitors wird das Fibringel innerhalb von 48 bis 72 Stunden durch Proteasen im Kulturmedium sowie zelluläre Fermente abgebaut. Durch Zugabe des Proteaseinhibitors Aprotinin kann der Abbau des Gels verhindert [105] und so die Degradation des Scaffolds dem Aufbau neuen Gewebes durch die integrierten Zellen angepaßt werden. Zur Steuerung dieses Prozesses bietet sich für zukünftige Versuche die Messung des Prokollagen-Peptids III (vgl. 7.2) als Marker der Kollagenproduktion an.

7.3.2 Einfluß der zellulären Komponenten

Experimente zu unterschiedlichen Zellzahlen im Fibringel wurden ursprünglich durchgeführt, um den Schrumpfungsprozess der Klappe zu unterdrücken. Diese Hoffnung erfüllte sich nicht; im Gegenteil führte eine Erhöhung der Zellzahl von 2,5 auf 5 und 10 Millionen Zellen pro Milliliter Gel zu einer noch stärkeren Schrumpfung. Gleichzeitig erfolgte aber auch eine schnellere Gewebeentwicklung, je mehr Zellen in die Herzklappen eingegossen wurden. Die höchste eingesetzte Zellzahl

von 10 Millionen Zellen pro Milliliter Gewebe führte zur besten Gewebeentwicklung nach 12 Tagen. Dabei erhöhte sich die Stabilität des Gewebes nach Entnahme aus dem Bioreaktor mit Erhöhung der Zellzahl. Außerdem zeigten Klappen, in die eine höhere Zellzahl eingegossen wurde, histologisch eine deutlich dichtere Gewebebildung mit vernetzten Zellverbänden und deutlicher Kollagenentwicklung (vgl. 6.5).

Ein Vergleich mit Kulturmethoden anderer Forschungsgruppen fällt hier schwer, da durch Besiedlungsprotokolle, die keine Gelstruktur nutzen, ein nicht quantifizierbarer Zellverlust eintritt, so dass die bei Beginn der Kultur vorhandene Zellzahl nicht genau angegeben werden kann. In einer Arbeit von Mol et al. wurde Fibrinogen eingesetzt, um die Zellausbeute bei der Besiedlung polymerer Scaffolds zu erhöhen [64]. Hierbei wurden ausschließlich Zellzahlen von 2,5 Millionen Zellen pro Milliliter Gel eingesetzt. Histologisch waren die Ergebnisse vergleichbar mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen für 2,5 Millionen Zellen nach 12 Tagen Kultur. Auch in den meisten anderen Arbeiten im Bereich des cardiovasculären Tissue Engineerings wurden meist Zellzahlen im Bereich von 2 bis 5 Millionen Zellen pro Milliliter Scaffold eingesetzt, wobei der durch die Besiedlung des Scaffolds eintretende Zellverlust nicht quantifiziert werden kann.

7.3.3 Einfluß der Kulturbedingungen im Bioreaktorsystem

Eine wichtige Einflußgröße auf die Gewebeentwicklung stellt die Frequenz dar, mit der die kultivierte Klappe geöffnet und geschlossen wird. Die dargestellten Ergebnisse (vgl. Kapitel 6.2) zeigen bei einer Schlagfrequenz von 5 Schlägen pro Minute zu Beginn der Kultur und mit nach 6 Tagen auf 10 Schläge pro Minute ansteigender Frequenz eine optimale Gewebeentwicklung. Bei höheren Frequenzen zu Beginn der Kultur erfolgt die Entwicklung langsamer, und ab einer Frequenz von

7 Diskussion

15 Schlägen pro Minute kommt es innerhalb des Scaffolds zum Untergang der Zellen. Eine fehlende Erhöhung der Schlagfrequenz führt zwar nicht zum Tod der Zellen, aber die weitere Entwicklung des Gewebes erfolgt verzögert. Entsprechend den von Lee et al. [55] erarbeiteten Ergebnissen stellen sich langsam ansteigende Scherkräfte auch als günstig für die Kultur tissue-engineerter Herzklappen mit Fibringel als Scaffold dar. Dabei beziehen sich die Ergebnisse auf ein endothelzellbesiedeltes Gewebe, so dass der Vergleich mit den hier vorgestellten Ergebnissen nur begrenzt möglich ist, da die an der Gewebeoberfläche auftretenden Scherkräfte nur auf die Endothelzellen als oberste Zellschicht eine Auswirkung haben können. Für die in der Tiefe des Gewebes liegenden Myofibroblasten sind Druckveränderungen im und Dehnung des Gewebes, also die Komponenten des Pulses, ausschlaggebende Belastungen. Hier führt eine langsame Erhöhung der Schlagfrequenz ebenfalls zu einer langsamen Erhöhung der dynamischen Belastungen. Dies wurde von Lee et al. nicht explizit untersucht und diskutiert. Da die Erhöhung der Scherkräfte mit einer Erhöhung der Häufigkeit einer Druckänderung und Dehnungsbelastung in den von Lee et al. durchgeführten Versuchen einherging, sind diese als Bestätigung der Ergebnisse dieser Arbeit zu sehen, die eine Verbesserung der Gewebeentwicklung mit zunehmender Schlagfrequenz zeigen.

Während der Einfluß langsam zunehmender dynamischer Belastung auf die Entwicklung tissue-engineerter vaskulärer Gewebe gut untersucht ist, gibt es keine aussagekräftigen Untersuchungen, ob unterschiedliche statische diastolische Lasten auf den Klappensegeln Auswirkungen auf die Entwicklung des Gewebes haben. Hoerstrup et al. [36] zollen dieser Fragestellung in ihrer Beschreibung des entwickelten Bioreaktorsystems keine Beachtung, während Dumont et al. [19] für ihr Konzept einen diastolischen Druck von maximal 80 mmHg distal der Klappe erwähnen, aber nicht genau steuern können, welcher Druck während der Diastole genau über den Klappensegeln abfällt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Kultur im Bioreaktor zunächst ohne Belastung der Klappensegel während der Diastole. Experimente mit einer statischen diastolischen Last von 2 cmH₂O wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Erhaltung der Geometrie der Gewebe während der Kultur zu verbessern. Dies bestätigte sich durch die durchgeführten Versuche, die eine deutliche Minderung der Formveränderung der Klappen während des Kulturprozesses zeigten.

Es wurden jedoch auch auf der Ebene der Gewebeentwicklung interessante Ergebnisse herausgearbeitet. Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass eine möglichst geringe statische diastolische Belastung der Segel zur besten Gewebeentwicklung führt, da die embryonale Klappenentwicklung ebenfalls ohne Belastung während der Diastole abläuft, liefert die Kultur bei einer diastolischen Last von 2 cm H₂O auf den Klappensegeln auf histologischer Ebene eine schnellere und dichtere Gewebeentwicklung als die Kultur ohne diastolische Belastung.

7.3.4 Gesamtbeurteilung

In den beschriebenen Versuchen wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Fibrinogenkonzentrationen, Zellzahlen, Schlagfrequenzen und einer diastolischen Last auf den Klappensegeln auf die Gewebeentwicklung untersucht. Sowohl im Hinblick auf die Widerstandsfähigkeit des Gewebes als auch auf die histologisch nachweisbare Gewebeentwicklung stellte sich hierbei eine Zellzahl von 10 Millionen Zellen pro Milliliter Gel bei diastolischer Belastung der Klappensegel mit 2 cmH₂O und langsam ansteigenden Scherkräften im Sinne einer Erhöhung der Schlagfrequenz von 5 Schlägen pro Minute auf 10 Schläge pro Minute am 6. Tag der Kultur als optimal dar. Ein Einfluß der Fibrinogenkonzentration auf die Gewebeentwicklung stellte sich mit den verwendeten Methoden nicht dar.

7 Diskussion

Unter solcherart optimierten Entwicklungsbedingungen zeigt die tissue-engineerte Klappe eine starke Tendenz zur Schrumpfung. Durch Fixation des Conduits am Silikonmantel mittels zweier grobmaschiger Textilringe aus PVDF konnte die Retraktion des Conduits wirkungsvoll bekämpft werden.

Es ist also im Rahmen dieser Arbeit gelungen, ein naht- und widerstandsfähiges Gewebe zu erzeugen. Der Gefäßstamm konnte in seiner Geometrie erhalten werden, wogegen die Schrumpfung der Klappensegel zu einer Insuffizienz der Klappe führte.

7.4 Feingewebliche Betrachtung der Gewebeentwicklung

Um die Gewebeentwicklung innerhalb der tissue-engineerten Klappen in einem Längsschnitt zu verfolgen, wurden Klappen über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen kultiviert (vgl. Kapitel 6.1). Während dieses Zeitraumes entwickelte sich ein immer dichter werdendes Netzwerk von Zellen und extrazellulärer Matrix. Nach 30 Tagen konnte in der Gefäßwand eine Schichtung in eine innen liegende, lockerer strukturierte Schicht mit hohem Faseranteil und eine darunter liegende Schicht, in der glatte Muskelzellen dicht gepackt aneinanderliegen, nachgewiesen werden. Diese Struktur erinnert an die native Aufteilung von Gefäßwänden in eine *Tunica media* und eine *Tunica intima*.

Auch innerhalb des Klappensegels konnte eine Aufteilung in eine ventrikuläre – locker strukturierte – Schicht mit einem geringen Anteil extrazellulärer Matrixproteine und eine arterielle Schicht, in der Zellen und extrazelluläre Matrix einen dichteren Verbund bilden, beobachtet werden. Vergleichbar ist dies mit Spongiosa und Fibrosa der nativen Klappe (vgl. Abbildung 7.1), auch wenn die Abgrenzung nicht so deut-

lich wie bei einer natürlichen Klappe sichtbar war und die einzelnen Schichten unstrukturierter wirkten.

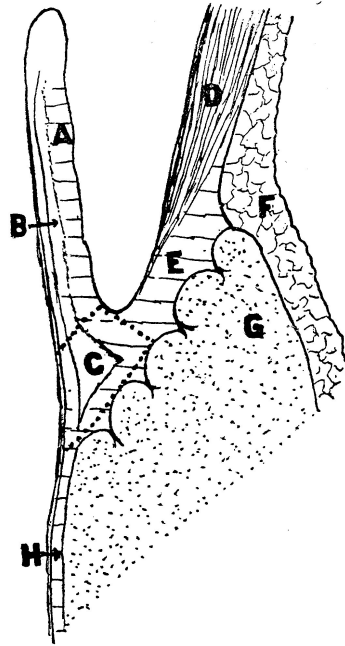


Abbildung 7.1: Mikroskopischer Aufbau der Semilunarklappen
A – Lamina fibrosa, B – Lamina spongiosa, C – Annuläre Spongiosa,
D – Pulmonalarterie, E – Annulus fibrosus, F – Pericard, G – Myocard
[27]

Zur weiteren Analyse des Ablaufs der Gewebeentwicklung wurden tissue-engineerte Klappen über Zeiträume von 6, 12, 24 und 30 Tagen kultiviert (vgl. Kapitel 6.1). Nach 6 Tagen Kulturdauer begannen die eingegossenen Zellen, Ausläufer zu bilden und sich im Fibringel auszuweiten, auch wenn viele Zellen noch abgekugelt erschienen. Nach weiteren 6 Tagen nahm die Anzahl der abgekugelten Zellen weiter ab und der Eindruck eines Netzwerkes aus Zellen entstand. Zu diesem Zeitpunkt konnte noch keine wesentliche Produktion extrazellulärer Ma-

7 Diskussion

trixproteine nachgewiesen werden.

Nach 24 Tagen zeigte sich ein Gewebeverband, eingebettet in extrazelluläre Matrixproteine. Dabei war noch keine Aufteilung in Schichten erkennbar; das gesamte Gewebe wirkte sehr homogen. Nach weiteren 6 Tagen Kultur konnten die oben beschriebenen Strukturen, also eine Schichtung des Gewebes, nachgewiesen werden.

Nachdem die Entwicklung des Gewebes innerhalb der tissue-engineerten Klappe analysiert wurde, wurden die Kulturbedingungen im Bioreaktorsystem im Rahmen dieser Arbeit optimiert. Durch die systematische Untersuchung und schrittweise Anpassung der Kulturbedingungen konnte eine etwa doppelt so schnelle Gewebeentwicklung erreicht werden:

Tabelle 7.1: Optimierte Kulturbedingungen

Fibrinkonzentration	5 mg / ml Gel
Zellzahl	10 Mio Zellen / ml Gel
Befestigung	PVDF Textilstruktur
Schlagfrequenz	5 / Minute, ab dem 6. Tag 10 / Minute
Diastolische Last auf den Klappensegeln	2 cm H ₂ O

Nach 12 Tagen Kultur unter optimierten Bedingungen (vgl. Tabelle 7.1) entsprach der Organisationsgrad des Gewebes etwa dem nach 24 Tagen Kultur unter den anfänglich gewählten Bedingungen, mit orientierten Zügen kollagener Fasern und länglichen, entlang der Gewebezüge angeordneten Zellen. In der unter „statischen“ Bedingungen kultivierten Kontrollgruppe, deren Kulturmedium mit einem Rührfisch durchmischt wurde, um die Nährstoffversorgung nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion sicherzustellen, konnte keine regelmäßige Anordnung der Zellen nachgewiesen werden. Die Zellzahl war nach Abschluss der

Kulturperiode geringer als bei im Bioreaktorsystem kultivierten Klappen, und die Zellen waren von Höfen, als Hinweis auf Zelluntergang, umgeben. Diese Beobachtung kann zum einen in der schlechteren Nährstoffversorgung der Zellen der Kontrollgruppe begründet sein, zum anderen aber ihren Ursprung im Fehlen von gerichteter mechanischer Stimulation haben.

In der immunhistochemischen Gewebeanalyse konnte der Zellphänotyp „Myofibroblast“ demonstriert werden, mit einer gegenüber den am Gewebeaufbau einer nativen Semilunarklappe beteiligten Zellen erhöhten Expression von Alpha-Smooth-Muscle-Actin (α -SMA). α -SMA kann dabei als Marker für durch diese Zellen induzierte verstärkte Umbauvorgänge innerhalb der extrazellulären Matrix gesehen werden, die eine erhöhte mechanische Belastung der Zellen normalisieren sollen [2].

Dabei führte die gerichtete mechanische Stimulation der im Bioreaktorsystem kultivierten Klappen zu mehr Produktion und strukturell höherer Organisation von Matrixproteinen als die ungerichtete Stimulation in der Kontrollgruppe, was sich auch in der Widerstandsfähigkeit der Gewebe niederschlug. Die Kollagene stellen mit einem Anteil von 50% am Trockengewicht einer nativen Herzklappe die wichtigsten extrazellulären Matrixproteine hinsichtlich der mechanischen Widerstandsfähigkeit dar [94]. Die Kollagene I und III, die zusammen mehr als 98% des valvulären Kollagens ausmachen, konnten ubiquitär in den Segeln und der Gefäßwand der kultivierten Klappen nachgewiesen werden. Dabei macht die hohe Syntheserate von Fibronectin und Laminin die intensiven Remodellingprozesse der extrazellulären Matrix deutlich.

Kritisch zu betrachten ist die mangelnde Elastinsynthese in den hier durchgeführten Versuchsreihen. Elastin ist ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix der Aorten- und in geringerem Maße auch der Pulmonalklappe (vgl. Kapitel 2.2.2), da es der Klappe Widerstandsfähigkeit gegenüber den Verformungen sowohl durch Öffnen

7 Diskussion

und Schließen der Klappe als auch durch den systolischen Blutstrom verleiht [27].

Mangelnde Elastinsynthese ist ein bekanntes Problem des valvulären Tissue Engineerings [69], wobei aktuelle Studien Elastinsynthese in Fibringelscaffolds nachweisen konnten [56]. Long und Tranquillo verwendeten bei diesen Versuchen allerdings neonatale glatte Muskelzellen der Aortenwand oder native Klappenzellen und betrachteten eine Kulturdauer von 4 Wochen, was den Vergleich mit den hier vorgestellten Versuchen schwierig macht. Eine Analyse der Elastinsynthese nach 4 Wochen Kultur im vorgestellten System kann hier weitere Informationen liefern. Im Zusammenhang mit der Betrachtung der Elastinsynthese zeigen die Versuche von Veggian et al., die eine hohe Syntheserate von Elastin durch Perikardzellen in Fibringel zeigen konnten, dass die Art der verwendeten Zellen deutlichen Einfluß auf die Elastinsynthese hat [99]. Insofern können die beschriebenen Ergebnisse anderer Autoren nur sehr eingeschränkt mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen werden.

Zusammenfassend gelingt es also, durch Kultur eines mit Myofibroblasten besiedelten Scaffolds aus Fibringel im beschriebenen Bioreaktorsystem eine tissue-engineerte Herzklappe herzustellen, deren mikroskopische Struktur sich im Verlaufe der Kultur bei fehlender Elastinsynthese immer weiter derjenigen einer nativen Herzklappe annähert.

8 Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es, das von Jockenhövel et al. erstmals beschriebene Gußverfahren für tissue-engineerte Herzklappen auf Fibrin-gelbasis [42] zu optimieren und ein auf die Anforderungen des Fibrin-gelscaffolds abgestimmtes Bioreaktorsystem zu entwickeln, in dem die Klappen *in vitro* kultiviert und mit Endothelzellen beschichtet werden können.

Das zugrundeliegende Gußverfahren wurde auf die Erfordernisse einer Routineanwendung durch Vereinfachung der Handhabung vorbereitet und ein Bioreaktorsystem zur *In-vitro*-Kultur entwickelt. Die Geometrie der Gußform sowie die Kulturbedingungen im Bioreaktorsystem waren im Rahmen dieser Arbeit Gegenstand intensiver Untersuchung und wurden optimiert. So war es möglich, die Gewebestruktur der tissue-engineerten Semilunarklappen derer nativer Klappen anzunähern und ein widerstandsfähiges Gewebe zu züchten. In einem weiteren Schritt wurde ein System zur Endothelzellbesiedlung tissue-engineerter Semilunarklappen entwickelt.

Die tissue-engineerten Semilunarklappen wurden im Rahmen einer Kleinversuchsreihe im Anschluss an diese Dissertation im Schafsmodell getestet. Sie konnten erfolgreich in Pulmonalposition implantiert werden und hielten den hämodynamischen Belastungen für die Dauer von 3 Monaten stand.

Zur Überwachung der Gewebekultur ist eine ständige Kontrolle der Qualität des Kulturmediums nötig. Diese konnte ebenfalls im Anschluss

8 Zusammenfassung

an diese Arbeit durch Integration einer Meßstrecke mit der Möglichkeit der Messung der Partialdrücke für O₂ und CO₂ sowie des pH-Wertes umgesetzt werden.

In Zukunft kann durch die Messung von Markern der Gewebeentwicklung sowie die Nutzung bildgebender Verfahren eine noch genauere Überwachung des Kulturprozesses ermöglicht und so die Qualität der tissue-engineerten Semilunarklappen weiter verbessert werden. Die Geometrie der Gußform sowie die Kulturbedingungen im Bioreaktorsystem müssen weiter Gegenstand der Entwicklung bleiben, um die Form der kultivierten Semilunarklappen weiter der nativen anzunähern. Auch die weitere Untersuchung der dem Tissue Engineering zugrunde liegenden Prozesse und ein besseres Verständnis der Einflußgrößen wird es ermöglichen, die Entwicklung tissue-engineerter Gewebe besser zu steuern.

Diese Entwicklungen werden hoffentlich dazu beitragen, die Möglichkeiten des operativen Herzklappenersatzes zu erweitern und die Behandlung von Herzklappenerkrankungen insbesondere im Kindesalter zu verbessern.

Literaturverzeichnis

- [1] Abbot ME. *Atlas of congenital cardiac disease*. American Heart Association, New York, 1936.
- [2] Aikawa E, Whittaker P, Farber M, Mendelson K, Padera RF und Aikawa M. Human semilunar cardiac valve remodelling by activated cells from fetus to adult: implications for post-natal adaption, pathology and tissue engineering. *Circulation*. 113(10):1344–1352, 2006.
- [3] Anderson JM und Schoen FJ. *Biomaterials Science*, Kapitel 5.3, Seite 360. Elsevier Academic Press, 2004.
- [4] Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G und Haverich A. Tissue engineering of heart valves—human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg*. 14(3):279–284, Sep 1998.
- [5] Barron V, Lyons E, Stenson-Cox C, McHugh PE und Pandit A. Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review. *Ann Biomed Eng*. 31(9):1017–1030, Oct 2003.
- [6] Bengtsson LA und Haegerstrand AN. Endothelialization of mechanical heart valves in vitro with cultured adult human cells. *J Heart Valve Dis*. 2(3):352–356, May 1993.
- [7] Blackstone EH und Kirklin JW. Death and other time-related

- events after valve replacement. *Circulation*. 72(4):753–767, Oct 1985.
- [8] Breuer CK, Mettler BA, Anthony T, Sales VL, Schoen FJ und Mayer JE. Application of tissue-engineering principles toward the development of a semilunar heart valve substitute. *Tissue Eng*. 10(11-12):1725–1736, Nov 2004.
- [9] Brutsaert DL, De Keulenaer DW, Franssen P, Mohan P, Kaluza GL, Andries LJ, Rouleau JL und Sys SU. The cardiac endothelium: functional morphology, development, and physiology. *Prog Cardiovasc Dis*. 39(3):239–62, Nov-Dec 1996.
- [10] Burns DK und Kumar V. *Robbins – Basic Pathology*, Kapitel 11, Seiten 374–394. SAUNDERS, 2002.
- [11] Cannegieter SC, Rosendaal FR und Briet E. Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses. *Circulation*. 89(2):635–641, Feb 1994.
- [12] Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, Hilfiker A, Mertsching H, Leyh R, Breymann T, Kallenbach K, Maniuc L, Batrinac A, Repin O, Maliga O, Ciubotaru A und Haverich A. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation*. 114(Suppl I):132–137, Jul 4 2006.
- [13] Cevalley B und Herbage D. Collagen based biomaterials as 3d scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput*. 38:211–218, 2000.
- [14] Cobanoglu A, Fessler CL, Guvendik L, Grunkemeier G und Starr A. Aortic valve replacement with the starr-edwards prosthesis: a comparison of the first and second decades of follow-up. *Ann Thorac Surg*. 45(3):248–252, Mar 1988.

- [15] Colas A und Curtis J. *Biomaterials Science*, Kapitel 2.3, Seite 80. Elsevier Academic Press, 2004.
- [16] Cooper SL, Visser SA, Hergenrother RW und Lamba NMK. *Biomaterials Science*, Kapitel 2.2, Seite 78. Elsevier Academic Press, 2004.
- [17] Cummings CL, Gawlitta D, Nerem RM und Stegemann JP. Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. *Biomaterials*. 25(17):3699–3706, Aug 2004. Evaluation Studies.
- [18] Dittrich S, Alexi-Meskishvili VV, Yankah AC, Dähnert I, Meyer R, Hetzer R und Lange PE. Comparison of porcine xenografts and homografts for pulmonary valve replacement in children. *Ann Thorac Surg*. 70:717–722, 2000.
- [19] Dumont K, Yperman J, Verbeken E, Segers P, Meuris B, Vandenberghe S, Flameng W und Verdonck PR. Design of a new pulsatile bioreactor for tissue engineered aortic heart valve formation. *Artif Organs*. 26(8):710–714, Aug 2002.
- [20] Emmanouilles GC. *Heart disease in infants, children and adolescents*, Kapitel Obstructive lesions of the right ventricle and pulmonary arterial tree, Seite 451. William and Wilkins Co., 1977.
- [21] Fedalen PA, Fisher CA, Todd BA, Mather PJ und Addonizio VP. Early fungal endocarditis in homograft recipients. *Ann Thorac Surg*. 68(4):1410–1411, Oct 1999. Case Reports.
- [22] Fischlein T, Lehner G, Lante W und Reichart B. Endothelialization of aldehyde-fixed cardiac valve bioprostheses. *Transplant Proc*. 24(6):2988, Dec 1992.

- [23] Flanagan TC und Pandit A. Living artificial heart valve alternatives: a review. *Eur Cell Mater.* 6:28–45, Nov 2003.
- [24] Fleischhauer K. *Benninghoff, Anatomie*, Kapitel 10, Seite 623. Urban & Schwarzenberg, 1994.
- [25] Freed LE und Vanjak-Novakovic G. *Principles of Tissue Engineering*, Kapitel Tissue Engineering Bioreactors, Seiten 143–156. Academic Press, San Diego, 2000.
- [26] Giannitsis E und Stierle U. *Basislehrbuch Innere Medizin*, Kapitel 1.13, Seiten 153–172. Urban & Fischer, 2004.
- [27] Gross L und Kugel MA. Topographic anatomy and histology of the valves in the human heart. *Am J Pathol.* 7:445–456, 1931.
- [28] Gulbins H, Dauner M, Petzold R, Goldemund A, Anderson I, Doser M, Meiser B und Reichart B. Development of an artificial vessel lined with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 128(3):372–377, Sep 2004.
- [29] Gulbins H, Goldemund A, Anderson I, Haas U, Uhlig A, Meiser B und Reichart B. Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 125(3):592–601, Mar 2003.
- [30] Gulbins H, Pritisanac A, Uhlig A, Goldemund A, Meiser BM, Reichart B und Daebritz S. Seeding of human endothelial cells on valve containing aortic mini-roots: Development of a seeding device and procedure. *Ann Thorac Surg.* 79(6):2119–26, 2005.
- [31] Guyton AC und Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*, Kapitel 14, Seite 145. SAUNDERS, 2000.

- [32] Guyton AC und Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*, Kapitel 20, Seiten 210–222. SAUNDERS, 2000.
- [33] Hanlon JG, Suggit RW, Gibbs E, McMeeking RM und Love JW. Geometric optimization of a tissue pattern for semilunar valve reconstruction. *J Heart Valve Dis.* 8(6):609–613, Nov 1999.
- [34] Hausdorfer G und Kramer H. *Kinderheilkunde und Jugendmedizin*, Kapitel 12.6, Seiten 382–385. Springer, 2004.
- [35] Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ und Mayer JE Jr. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation.* 102(19 Suppl 3):44–49, Nov 2000.
- [36] Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP und Mayer JE Jr. New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves. *Tissue Eng.* 6(1):75–79, Feb 2000.
- [37] Hokken RB, Bartelings MM, Bogers AJ und Gittenberger-de Groot AC. Morphology of the pulmonary and aortic roots with regard to the pulmonary autograft procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 113(3):453–461, Mar 1997.
- [38] Hutmacher DW, Goh JC und Teoh SH. An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *Ann Acad Med Singapore.* 30(2):183–191, Mar 2001.
- [39] Jamieson WR, Munro AI, Miyagishima RT, Allen P, Burr LH und Tyers GF. Carpentier-edwards standard porcine bioprosthesis: clinical performance to seventeen years. *Ann Thorac Surg.* 60(4):999–1006, Oct 1995.
- [40] Jockenhoevel S. Persönliche Kommunikation.

- [41] Jockenhoevel S, Chalabi K, Roehl A, Sachweh J und Messmer BJ. Cardiovascular tissue engineering: Vascular composite graft based on a macroporous mesh. *ASAIO J.* 47(2):168, 2001.
- [42] Jockenhoevel S, Chalabi K, Sachweh JS, Groesdonk HV, Demircan L, Grossmann M, Zund G und Messmer BJ. Tissue engineering: complete autologous valve conduit—a new moulding technique. *Thorac Cardiovasc Surg.* 49(5):287–290, Oct 2001.
- [43] Jockenhoevel S, Strehlau E, Dresbach H, Schilling L und Autschbach R. Cardiovascular tissue engineering. procollagen-peptid iii as marker for tissue development. 32nd Annual Meeting of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. Moderated Poster Session., 2003.
- [44] Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, Chalabi K, Sachweh JS, Demircan L, Messmer BJ und Turina M. Fibrin gel – advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg.* 19(4):424–430, Apr 2001.
- [45] Kadner A, Hoerstrup SP, Tracy J, Breymann C, Maurus CF, Melnitchouk S, Kadner G, Zund G und Turina M. Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering. *Ann Thorac Surg.* 74(4):1422–1428, Oct 2002.
- [46] Kadner A, Hoerstrup SP, Zund G, Eid K, Maurus C, Melnitchouk S, Grunenfelder J und Turina MI. A new source for cardiovascular tissue engineering: human bone marrow stromal cells. *Eur J Cardiothorac Surg.* 21(6):1055–1060, Jun 2002.
- [47] Kadner A, Zund G, Maurus C, Breymann C, Yakarisik S, Kadner G, Turina M und Hoerstrup SP. Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *Eur*

J Cardiothorac Surg. 25(4):635–641, Apr 2004. Evaluation Studies.

- [48] Karino T und Goldsmith HL. Flow behaviour in models of branching vessels. ii. effect of branching angle and diameter ratio in flow patterns. *Biorheology.* 22:87, 1984.
- [49] Klatt EC. Calcified aortic valve. Web Archiv, Pathology Department, University of Utah Health Sciences. Salt Lake City, Utah, USA., 2002.
- [50] Klinke R und Silbernagel S. *Lehrbuch der Physiologie*, Kapitel 8, Seite 183. Georg Thieme Verlag, 1996.
- [51] Klinke R und Silbernagel S. *Lehrbuch der Physiologie*, Kapitel 8, Seite 125. Georg Thieme Verlag, 1996.
- [52] Langer R und Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 260(5110):920–926, May 1993.
- [53] Lee JM, Courtman DW und Boughner DR. The glutaraldehyde-stabilized porcine aortic valve xenograft. 1. tensile viscoelastic properties of the fresh leaflet material. *J Biomed Mater Res.* 18(1):61–77, Jan 1984.
- [54] Lee KY und Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev.* 101(7):1869–1879, Jul 2001.
- [55] Lee RT, Schoen FJ, Loree HM, Lark MW und Libby P. Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis. implications for plaque rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16:1070, 1996.
- [56] Long JL und Tranquillo RT. Elastin production in cardiovascular tissue equivalents. *Matrix Biol.* 22(4):339–350, 2003.

- [57] Lüders C, Sodian R, Shakibaei M und Hetzer R. Short-term culture of human neonatal myofibroblasts seeded using a novel three-dimensional rotary seeding device short term culture of human neonatal myofibroblasts seeded using a novel three-dimensional rotary seeding device. *ASAIO J.* 52(3):310–314, May-Jun 2006.
- [58] MacGregor DC, Wilson GJ, Scully HE, Lixfeld W, Bobynd JD, Pilliar RM und Silver MD. Improved thromboresistance of mechanical heart valves with endothelialization of porous metal surfaces. *Surg Forum.* 30:239–241, 1979.
- [59] Maron BJ und Hutchins GM. The development of the semilunar valves in the human heart. *Am J Pathol.* 74(2):331–344, Feb 1974.
- [60] Mayer JE Jr. In search of the ideal valve replacement device. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 122(1):8–9, Jul 2001. Comment.
- [61] Mitchell NM und Cotran RS. *Robbins – Basic Pathology*, Kapitel 2, Seiten 33–59. SAUNDERS, 2002.
- [62] Mocellin R. Pulmonalatresie mit ventrikelseptumdefekt. Behandlungsergebnisse 1963 bis 1976 und diagnostische maßnahmen unter besonderer berücksichtigung der großen kollateralgefäße. *Zeitschrift für Kardiologie.* 66:382, 1977.
- [63] Mol A, Bouten CVC, Baaijens FPT, Zund G, Turina MI und Hoerstrup SP. Review article: Tissue engineering of semilunar heart valves: current status and future developments. *J Heart Valve Dis.* 13(2):272–280, Mar 2004.
- [64] Mol A, van Lieshout MI, Dam-de Veen CG, Neuenschwander S, Hoerstrup SP, Baaijens FPT und Bouten CVC. Fibrin as a cell

carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomaterials*. 26(16):3113–3121, Jun 2005.

- [65] Netter FH. *Atlas der Anatomie des Menschen*, Kapitel 3, Seiten 209–211. Novartis, 2000.
- [66] Neuenschwander S und Hoerstrup SP. Heart valve tissue engineering. *Transpl Immunol*. 12(3-4):359–365, Apr 2004.
- [67] Nguyen CN. Kardiovaskuläres tissue engineering auf der basis einer fibringelmatrix. optimierung der matrix hinsichtlich isolation, synthese und mechanischer festigkeit. Dissertation, Medizinische Fakultät der RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen, 2007.
- [68] Niemeyer C. *Kinderheilkunde und Jugendmedizin*, Kapitel 12, Seite 393. Springer, 2004.
- [69] Patel A, Fine B, Sandig M und Mequanint K. Elastin biosynthesis: The missing link in tissue engineered blood vessels. *Cardiovascular Research*. 71:40–49, 2006.
- [70] Pelham RJ Jr und Wang YL. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate. *Biol Bull*. 194(3):348–349, Jun 1998.
- [71] Penick KJ, Solchaga LA, Berilla JA und Welter JF. Performance of polyoxymethylene plastic (pom) as a component of a tissue engineering bioreactor. *J Biomed Mater Res A*. 75(1):168–174, Oct 2005.
- [72] Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*, Kapitel 26.2.1, Seite 743. Springer, 1998.
- [73] Romeis B. *Mikroskopische Technik*, Kapitel 9, Seite 174. Oldenbourg, 1968.

- [74] Romeis B. *Mikroskopische Technik*, Kapitel 29, Seite 371. Oldenbourg, 1968.
- [75] Rothenburger M, Vischer P, Volker W, Glasmacher B, Berendes E, Scheld HH und Deiwick M. In vitro modelling of tissue using isolated vascular cells on a synthetic collagen matrix as a substitute for heart valves. *Thorac Cardiovasc Surg.* 49(4):204–209, Aug 2001.
- [76] Rothenburger M, Volker W, Vischer JP, Berendes E, Glasmacher B, Scheld HH und Deiwick M. Tissue engineering of heart valves: formation of a three-dimensional tissue using porcine heart valve cells. *ASAIO J.* 48(6):586–591, Nov 2002.
- [77] Rousseau EPM, Sauren AAHJ, van Hout MC und van Steenhoven AA. Elastic and viscoelastic material behaviour of fresh and glutaraldehyde-treated porcine aortic valve tissue. *J Biomechanics.* 16(5):339–348, 1983.
- [78] Ruckman RN und van Praagh R. Anatomic types of congenital mitral stenosis: report of 49 autopsy cases with consideration of diagnosis and surgical implications. *Am J Cardiol.* 42:592, 1978.
- [79] Sage H, Pritzl P und Bornstein P. Secretory phenotypes of endothelial cells in culture: comparison of aortic, venous, capillary and corneal endothelium. *Arteriosclerosis.* 1(6):427–442, Nov-Dec 1981.
- [80] Schnell AM, Hoerstrup SP, Zund G, Kolb S, Sodian R, Visjager JF, Grunfelder J, Suter A und Turina M. Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts. *Thorac Cardiovasc Surg.* 49(4):221–225, Aug 2001.

- [81] Schumacher G und Brodherr S. *Diagnostik angeborener Herzfehler*, Kapitel HK/A, Seite 103. perimed Fachbuchverlagsgesellschaft, 1989.
- [82] Schumacher G und Bühlmeier G. *Diagnostik angeborener Herzfehler*, Kapitel 2.7, Seite 408. perimed Fachbuchverlagsgesellschaft, 1989.
- [83] Schumacher G und Bühlmeier K. *Diagnostik angeborener Herzfehler*, Kapitel 2.3, Seiten 322–338. perimed Fachbuchverlagsgesellschaft, 1989.
- [84] Schumacher G und Bühlmeier K. *Diagnostik angeborener Herzfehler*, Kapitel 2.6, Seite 384. perimed Fachbuchverlagsgesellschaft, 1989.
- [85] Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, Langer R, Vacanti JP und Mayer JE Jr. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg.* 60(6 Suppl):513–516, Dec 1995.
- [86] Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E und Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve synergraft in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 23(6):1002–1006, Jun 2003.
- [87] Skalak R und Fox CF. Tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 19:529–532, 1991.
- [88] Sodian R, Loebe M, Hein A, Martin DP, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Lueth T und Hetzer R. Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. *ASAIO J.* 48(1):12–16, Jan 2002.

- [89] Staubesand J. *Benninghoff, Anatomie*, Kapitel 10.4, Seite 656. Urban & Schwarzenberg, 1994.
- [90] Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Melliss RR, Pethig K, Haverich A und Bader A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation*. 102(19 Suppl 3):50–55, Nov 2000.
- [91] Stock UA und Vacanti JP. Cardiovascular physiology during fetal development and implications for tissue engineering. *Tissue Eng*. 7(1):1–7, Feb 2001.
- [92] Stock UA, Vacanti JP, Mayer JE Jr und Wahlers T. Tissue engineering of heart valves – current aspects. *Thorac Cardiovasc Surg*. 50(3):184–193, Jun 2002.
- [93] Swanson M und Clark RE. Dimensions and geometric relationships of the human aortic valve as a function of pressure. *Circ Res*. 35(6):871–882, Dec 1974.
- [94] Taylor PM, Allen SP, Dreger SA und Yacoub MH. Human cardiac valve interstitial cells in collagen sponge: a biological three-dimensional matrix for tissue engineering. *J Heart Valve Dis*. 11(3):298–306, May 2002. Evaluation Studies.
- [95] Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS und Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 35(2):113–118, Feb 2003.
- [96] Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C und Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(5):349–363, May 2002.

- [97] Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A und Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg.* 23(1 Pt 2):3–9, Jan 1988.
- [98] van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, van Beusekom HM, Serruys PW, Holmes DR Jr, Ellis SG und Topol EJ. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation.* 94(7):1690–1697, Oct 1996.
- [99] Veggian P, Sachweh JS, Flanagan TC, Koch S, Tschoeke B, Schmitz-Rode T und Jockenhoevel S. Ex vivo expansion of pericardial patch structures. *Tissue Eng.* 13(7):1692, 2007.
- [100] Vongapatsin W, Hillis D und Lange RA. Prosthetic heart valves. *N Engl J Med.* 335:407, 1996.
- [101] Wagner WH, Henderson RM, Hicks HE, Banes AJ und Jonson G Jr. Differences in morphology, growth and protein synthesis between cultured arterial and venous endothelial cells. *J Vasc Surg.* 8(4):509–519, Oct 1988.
- [102] Walles T, Lichtenberg A, Puschmann C, Leyh R, Wilhelmi M, Kallenbach K, Haverich A und Mertsching H. In vivo model for cross-species porcine endogenous retrovirus transmission using tissue engineered pulmonary arteries. *Eur J Cardiothorac Surg.* 24(3):358–363, Sep 2003.
- [103] Walles T, Puschmann C, Haverich A und Mertsching H. Acellular scaffold implantation—no alternative to tissue engineering. *Int J Artif Organs.* 26(3):225–234, Mar 2003. Evaluation Studies.
- [104] Wilson GJ, Courtman DW, Klement P, Lee JM und Yeger H. Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery

- bypass and heart valve replacement. *Ann Thorac Surg.* 60(2 Suppl):353–358, Aug 1995.
- [105] Ye Q, Zund G, Benedikt P, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Sakayama S, Hubbell JA und Turina M. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg.* 17(5):587–591, May 2000.
- [106] Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, Kidd ID und Sibanda B. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. *Tissue Eng.* 7(1):9–22, Feb 2001.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Unterteilung des primitiven Ausflusstraktes in Aorta und Pulmonalarterie [59]	3
2.2	Ausbildung der Semilunarklappen [59]	4
2.3	Einblick in den ventrikulären Ausführungstrakt [65]	5
2.4	Aufsicht auf die Segel der Aortenklappe [65]	6
2.5	Aufsicht auf das Herzskelett in der Diastole [65]	7
2.6	Makroskopisches Präparat eines Aortenklappensegels [77]	7
2.7	Dimensionen der Aortenklappe (Durchmesser des ventrikulären Ausflusstraktes wird $d=1$ gesetzt) [93]	8
2.8	Mikroskopischer Aufbau der Semilunarklappen	11
2.9	Druck im Pulmonaltrunkus während eines Herzschlages [81]	12
2.10	Druck im rechten Ventrikel während eines Herzschlages [81]	13
2.11	Herzfrequenz und Blutdruck in Abhängigkeit vom Alter [50]	14
2.12	Stromstärke in der Aortenwurzel während eines Herzschlages [51]	15
2.13	Definition radial – circumferent [77]	16
2.14	Stress-Strain-Kurven der Aortenklappe	17
2.15	Verkalkte Aortenklappe [49]	20
3.1	Prinzip des valvulären Tissue Engineerings	28

3.2	5-Jahres-Versagenswahrscheinlichkeit von Bioprothesen in Abhängigkeit vom Alter der Patienten bei Operation (nach Blackstone et al.) [7]	30
3.3	Vergleich der Operationsfreiheit zehnjähriger Kinder nach Klappenersatz durch Homografts und Xenografts (nach Dittrich et al.) [18]	32
3.4	Vergleich der Interventionsfreiheit nach Klappenersatz durch Homografts und Xenografts bei sechsjährigen Kindern (nach Dittrich et al.) [18]	32
3.5	Bioreaktoren für cardiovasculäre Strukturen	52
3.6	Bioreaktor nach Hoerstrup [36]	53
3.7	Plötzliche Rohrerweiterung mit annulärer Wirbelbildung [48]	54
3.8	Bioreaktor nach Dumont [19]	55
4.1	Fibringel als Scaffold des Valvulären Tissue Engineerings	60
4.2	Gussform Version II (ohne Silikonmantel)	64
4.3	Weiterentwicklung der Klappenaufhängung	66
4.4	Modifikationsschritte des aortalen Gussstempels	68
4.5	Modifikationsschritte des pulmonalen Stempels	69
4.6	Tabellarische Übersicht über die Geometrie einer gegossenen Klappe mit erklärender Schemazeichnung.	71
4.7	Besiedlungskammer, montiert auf der Rollerpumpe. Die Abbildung läßt die Verkippung der Besiedlungskammer um 30° gegenüber der vertikalen Ebene erkennen, die eine Bewegung in zwei Raumrichtungen zusätzlich zur Drehachse ermöglicht.	73
4.8	Bestandteile der Endothelzellbeschichtungskammer	73
4.9	Bioreaktor Version I	75
4.10	Bioreaktor Version II	78
4.11	Technische Zeichnung des Bioreaktors. Version I.	80

6.1 Gewebeentwicklung über 30 Tage, Teil 1 (6 und 12 Tage): Trichrom- und HE-Färbung der Übergangsregion zwischen Pulmonalarterie und Klappensegel (a – d) und des Klappensegels (e – f). In der HE Färbung nach 6 und 12 Tagen (a, b) noch Anzeichen des Zellunterganges. Im Verlauf Abnahme dieser, und Nachweis von in die extrazelluläre Matrix eingebetteten Zellen (6.2 a, b). Maßstab: a-b Balkenlänge 37,5 μm ; c-f Balkenlänge 150 μm 105

6.2 Gewebeentwicklung über 30 Tage, Teil 2 (24 und 30 Tage): Trichrom- und HE-Färbung der Übergangsregion zwischen Pulmonalarterie und Klappensegel (a – d) und des Klappensegels (e – f). Die Trichromfärbung läßt nach 24 Tagen (c) eine geringe Produktion extrazellulärer Matrixproteine erkennen. Nach 30 Tagen ist im Gewebe ein dichtes Netzwerk extrazellulärer Matrixproteine vorhanden (d). Innerhalb des Klappensegels entwickelte sich eine Zweischichtung des Gewebes (f), vergleichbar mit Spongiosa und Fibrosa einer nativen Pulmonalklappe. Maßstab: a-b Balkenlänge 37,5 μm ; c-f Balkenlänge 150 μm 106
173

- 6.3 Einfluß der Schlagfrequenz auf die Gewebeentwicklung, Teil 1: HE-Färbung (c - d) und Trichromfärbung (a - b) der Übergangsregion zwischen Pulmonalarterienstamm und Klappensegel. Nach 12 Tagen Kultur bei Frequenzen von 5 beziehungsweise 15 Schlägen pro Minute keine Gewebeentwicklung. In der HE-Färbung erscheinen die Zellen bei einer Frequenz von 5 Schlägen / Minute (c) nach 12 Tagen Kultur abgekugelt, bei einer Frequenz von 15 Schlägen pro Minute (Abb. 6.4, c) kommen direkte Zeichen des Zellunterganges im Sinne einer abgeschwächten Kernfärbung und Cariorhexis zur Darstellung; in den Trichrom-gefärbten Präparaten (a und Abb. 6.4, a) ist keine Bildung extrazellulärer Matrixproteine nachweisbar. Maßstab: Balkenlänge c-d 37,5 μm , a-b 150 μm 108
- 6.4 Einfluß der Schlagfrequenz auf die Gewebeentwicklung, Teil 2: HE-Färbung (c - d) und Trichromfärbung (a - b) der Übergangsregion zwischen Pulmonalarterienstamm und Klappensegel. Bei einer Schlagfrequenz von 10 Schlägen pro Minute fallen in der HE-Färbung (Abb. 6.3, d) länglich ausgezogene und gut in das Fibringel eingebaute Zellen auf; die Trichromfärbung (Abb. 6.3, b) liefert zwischen den Zellfortsätzen erste Hinweise auf eine Produktion extrazellulärer Matrixproteine. Bei Beginn der Kultur mit einer Pulsfrequenz von 5 Schlägen pro Minute und Steigerung der Frequenz auf 10 Schläge pro Minute ab dem sechsten Tag läßt sich nach insgesamt 12 Tagen Kultur ein entlang der Gefäßwand orientierter Gewebeverband mit schwacher Produktion extrazellulärer Matrixproteine nachweisen (c und d). Maßstab: Balkenlänge c-d 37,5 μm , a-b 150 μm 109

- 6.5 Einfluß der Zellzahl auf die Gewebeentwicklung: HE-Färbung (a - c) und Trichromfärbung (d - f) der Übergangsregion zwischen Pulmonalarterienstamm und Klappensegel. Mit steigender Zellzahl war eine vermehrte Produktion extrazellulärer Matrixproteine festzustellen (d - f). Bei 10 Millionen Zellen pro Milliliter Gel kam es zur Bildung von Höfen um die Zellen (c). Maßstab: Balkenlänge a-c 37,5 μm , d-f 150 μm 111
- 6.6 Gewebefestigung am Silikonconduit. Es ist ein extremes Beispiel der Gewebeschrumpfung bei 10 Millionen eingegossenen Zellen pro Milliliter Gel ohne Befestigung (a) im Vergleich zur Befestigung mit einem PVDF-Streifen (b) am proximalen und distalen Ende des Gewebestückes abgebildet. 113
- 6.7 Erprobung unterschiedlicher Befestigungsmöglichkeiten. Abbildung (a) zeigt die extreme Schrumpfung des Gewebes ohne Befestigung. Bei Befestigung mit Hilfe von Einzelknopfnähten oder Dacronstreifen bot sich ein ähnliches Bild (b + c). Wurden die Klappen am proximalen und distalen Ende mit einem Streifen einer PVDF-Textilstruktur befestigt (d), so konnte der Schrumpfprozeß eingedämmt werden. 115
- 6.8 Erprobung diastolischer Lasten von 0 cm H₂O (a) und 2 cm H₂O (b): Makroskopie. Ohne diastolische Last auf den Klappensegeln (a) schrumpfte das tissue-engineerte Gewebe stark. Durch Anlegen einer diastolischen Last von 2 cm H₂O konnte dies vermindert werden. 116

- 6.9 Erprobung diastolischer Lasten von 0 cm H₂O (a + c) und 2 cm H₂O (b + d): HE-Färbung (a + b) und Trichrom-Färbung (c + d). Bei Aufbringen einer diastolischen Last auf die Klappensegel erhöhte sich die Produktion extrazellulärer Matrixproteine (c + d). Maßstab: Balkenlänge a+b 37,5 µm, c+d 150 µm. 117

- 6.10 Auswirkungen unterschiedlicher Fibrinogenkonzentrationen: Makroskopie (a - c) und Trichromfärbung histologischer Schnitte (d - f). Makroskopisch sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den Ansätzen zu erkennen. Auf histologischer Ebene fiel mit Erhöhung der Fibrinogenkonzentration eine verminderte Produktion extrazellulärer Matrixproteine auf (d - f). Maßstab: Balkenlänge d-f 150 µm. 119

- 6.11 Blutgasanalysen des Kulturmediums 121

- 6.12 Tissue-engineerte Klappe nach 12 Tagen Kultur im Bioreaktorsystem - Makroskopie. Maßstab: Balkenlänge 9,5 mm. 122

- 6.13 Trichromfärbungen von Anteilen des Klappensegels (a - c) und der Wand des Pulmonalarterienstammes (d - f) einer nativen ovinen Aortenklappe (a + d), einer statisch kultivierten, tissue-engineerten Klappe (b + e) und einer tissue-engineerten Klappe nach zwölf-tägiger Kultur im Bioreaktorsystem (c + f). Die im Bioreaktorsystem kultivierte Semilunarklappe (c + f) läßt ein vernetztes, geschichtetes Gewebe, annähernd vergleichbar mit dem Gewebe einer nativen Semilunarklappe (a + d) erkennen. In der statischen Kontrolle (b + e) war die Produktion extrazellulärer Matrixproteine und deren Organisationsgrad geringer. Maßstab: Balkenlänge 150 µm. 123

- 6.14 Immunhistochemische Färbungen für Vimentin (A - F) und glattes Muskelaktin (G - L). Sowohl im nativen Gewebe als auch in beiden Kulturansätzen exprimierten die Zellen Vimentin (A - F). Glattes Muskelaktin wurde, im Gegensatz zur nativen Klappe (G + H), in den meisten Zellen der im Bioreaktorsystem kultivierten Klappen (K + L) nachgewiesen und zu einem geringeren Anteil in den Zellen der statischen Kontrolle (I + J). Maßstab: Balkenlänge 250 μm 127
- 6.15 Immunhistochemische Färbungen für von Willebrand-Faktor (M - R) und Fibrinogen (S - X). Auf der nativen Klappe konnte die Färbung gegen von Willebrand-Faktor (M + N) eine konfluente Endothelzellschicht auf der Klappe und der Gefäßwand nachweisen; ein entsprechendes Signal fehlte auf beiden tissue-engineerten Klappen (O - R). Fibrinogen war im nativen Gewebe (S + T) nicht darstellbar, wogegen es in den tissue-engineerten Geweben als einer der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix auffiel (U - X). Maßstab: Balkenlänge 250 μm 128
- 6.16 Immunhistochemische Färbungen für Poly-4-Hydroxylase (A - F) und Kollagen I (G - L). In allen Gruppen kam eine vergleichbare Expression von Poly-4-Hydroxylase (A - F) zur Darstellung. In der statischen Kontrolle konnten Kollagen I und III nicht nachgewiesen werden (I, J, Abb. 6.17 O, P). In den nativen ovinen Aortenklappen (G, H, Abb. 6.17 M, N) und den im Bioreaktor kultivierten Klappen (K, L, Abb. 6.17 Q, R) fiel eine ubiquitäre Verteilung von Kollagen I und III auf. Maßstab: Balkenlänge 250 μm 129

6.17	<p>Immunhistochemische Färbungen für Kollagen III (M - R) und Kollagen V (S - X). In der statischen Kontrolle konnten Kollagen I und III nicht nachgewiesen werden (I, J, O, P). In den nativen ovinen Aortenklappen (G, H, M, N) und den im Bioreaktor kultivierten Klappen (K, L, Q, R) fiel eine ubiquitäre Verteilung von Kollagen I und III auf. Kollagen V zeigte in allen Gruppen kein Signal (S - X). Maßstab: Balkenlänge 250 μm.</p>	130
6.18	<p>Immunhistochemische Färbungen für Elastin (A - F) und Fibronektin (G - L). Elastin, ein extrazelluläres Funktionsprotein der nativen Klappe (A und B), kam in den tissue-engineerten Geweben nicht zur Darstellung (C - F). Das valvuläre Glykoprotein Fibronektin zeigte in Geweben aus dem Bioreaktorsystem (K + L) eine höhere Dichte als in den statischen Kontrollen (I + J). In beiden Gruppen war die Verteilung zellgebunden. Maßstab: Balkenlänge 250 μm.</p>	131
6.19	<p>Immunhistochemische Färbungen für Laminin (M - R) und Chondroitinsulfat (S - X). Das valvuläre Glykoprotein Fibronektin zeigten in Geweben aus dem Bioreaktorsystem (Q + R) eine höhere Dichte als in den statischen Kontrollen (O + P). In beiden Gruppen war die Verteilung zellgebunden. Chondroitinsulfat wies in tissue-engineerten Geweben, die im Bioreaktorsystem kultiviert wurden (W + X), eine annähernd physiologische, gleichmäßige Verteilung (S + T) auf. Demgegenüber war die Verteilung in der statisch kultivierten Kontrollgruppe stark zellgebunden (U + V). Maßstab: Balkenlänge 250 μm.</p>	132
7.1	<p>Mikroskopischer Aufbau der Semilunarklappen</p>	151

Eigene Publikationen

- Fallbericht: Aktinomykose als seltene Ursache einer symptomatischen Epilepsie. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie 2009. Posterpräsentation.
- Enhanced tissue development in autologous tissue-engineered heart valves using a customised bioreactor conditioning system. 5. Gemeinsame Jahrestagung. Deutsche, Österreichische und Schweizer Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie. Innsbruck 2008. Thorac cardiovasc Surg 2008 supp:V111.
- The in vitro development of autologous fibrin-based tissue-engineered heart valves through optimised dynamic conditioning. Biomaterials 2007 Aug;28(23):3388-97
- Quality management in cardiovascular tissue-engineering. 1st Intern. Congress Cardiac Surgery in the 3rd Millenium. Biological Solutions, Salzburg 2005. Thorac cardiovasc Surg 2005: Suppl. 53.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mit Ihrer Hilfe und Geduld diese Dissertation ermöglicht haben. Im Einzelnen sind dies:

Mein Betreuer, Herr Dr. med. Stefan Jockenhövel, der mir die Arbeit an diesem Thema zu ermöglichte und mit dem gemeinsam in vielen kurzen und langen Diskussionen die Ideen dieses Projektes entstanden. Dabei hinderte mich Herr Prof. Dr. med. Bruno Messmer stets daran, abzuschweifen. Herr Holger Fuchs, Frau Sabine Koch und Frau Sabine Überschär führten mich in die Techniken der Zellkultur und die Zellbiologie ein. Herrn Ali Kashefi verdanke ich viel Unterstützung bei den technischen Zeichnungen der Bioreaktoren, deren viele große und kleine Änderungen Herr Rainer Dautzenberg durchführte. Die Qualität der histologischen und immunhistochemischen Färbungen beruht nicht zuletzt auf der Hilfe von Herrn Tom Flanagan und Frau Sabine Koch. Herrn Thaddäus Stopinski danke ich für die Betreuung unserer Versuchstiere sowie viele praktische Hinweise.

Ich danke meiner Familie und insbesondere meiner Frau Anne Cornelissen, die mich in vielen schwierigen Situationen gestützt hat. Ohne ihre Geduld und ihren fachlichen Rat wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Erklärung zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

bei mir, Christian Gabriel Cornelissen, Schloßstraße 19, 52066 Aachen, hinterlegt sind.

Lebenslauf

Geboren am 1.11.1980 in Köln

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

- 1987 – 1991 Katholische Grundschule Volberger Weg in Köln-Rath
- 2000 Abitur am Städtischen Gymnasium Thusneldastraße in Köln-Deutz
- 2000 – 2001 Zivildienst beim Rettungsdienst der Stadt Köln

Hochschulbildung

- 2001 Beginn des Medizinstudiums
- 2003 Physikum nach alter Approbationsordnung
- 2007 2. Staatsexamen nach neuer Approbationsordnung und Approbation als Arzt

Klinische Tätigkeit

- Januar - Dezember 2008 Medizinische Klinik I des Universitätsklinikums Aachen, Sektion Pneumologie, Infektionsstation
- Januar - Juni 2009 Medizinische Klinik I des Universitätsklinikums Aachen, Sektion Pneumologie, Intermediate Care
- Seit Juli 2009 Medizinische Klinik I des Universitätsklinikums Aachen, Sektion Pneumologie, Lungenfunktion