



Aus dem Lehrstuhl für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie

Direktor:

Professor Dr. med. C. Schmid

Der Medizinischen Fakultät

der Universität Regensburg

In vitro Haemokompatibilitätstestung cardiovascularer Biomaterialien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Medizinischen Fakultät

der

Universität Regensburg

vorgelegt von Simon Benjamin Schopka

2008



Aus dem Lehrstuhl für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie

Direktor:

Professor Dr. med. C. Schmid

Der Medizinischen Fakultät

der Universität Regensburg

In vitro Haemokompatibilitätstestung cardiovascularer Biomaterialien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Medizinischen Fakultät

der

Universität Regensburg

vorgelegt von Simon Benjamin Schopka

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Christof Schmid

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Christian Hengstenberg

Tag der mündlichen Prüfung:

04.03.2009

1. Einleitung	- 3 -
2. Fragestellung der Arbeit	- 8 -
3. Materialien	- 9 -
3.1. ELISAs und Antikörper	- 9 -
3.2. Geräte und Messapparatur	- 9 -
3.3. Verbrauchsmaterialien	- 10 -
3.4. Zellkulturmedien und Lösungen	- 12 -
3.5. Weiterhin benötigte Medien und Lösungen	- 13 -
4. Methodik	- 15 -
4.1. Zellkultur	- 15 -
4.1.1. Isolierung humaner Vena saphena magna Endothelzellen (HSVEC)	- 15 -
4.1.2. Isolierung humaner aortaler Fibroblasten (HAF)	- 16 -
4.1.3. Kultivierung der Endothelzellen und Fibroblasten	- 16 -
4.1.4. Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometer	- 16 -
4.1.5. Reinheitsbestimmung mittels CD31 Färbung	- 17 -
4.2. Bearbeitung der Biomaterialien	- 18 -
4.2.1. Vorbereitung der Probenstücke	- 18 -
4.2.2. Aussaat von HSVEC/HAF auf den Proben	- 19 -
4.2.3. Rasterelektronenmikroskopie	- 19 -
4.2.4. Bestimmung der Zellzahl auf biologischem Material mittels Rasterelektronenmikroskopie	- 21 -
4.2.5. Immunhistochemie	- 21 -
4.2.6. Cell Titer 96® Aqueous One Solution Proliferation Assay	- 23 -
4.2.7. Interleukin 6 ELISA	- 24 -
4.2.8. Adhäsionstest mit peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	- 25 -
4.2.9. 6-keto Prostaglandin F 1 α -Enzyme Immunoassay	- 27 -
4.2.10. Adhäsionstest mit Thrombozyten	- 28 -
4.2.11. 3H-Methyl-Thymidineinbau als Proliferationsmarker	- 30 -
4.3. Statistische Auswertung	- 31 -
5. Ergebnisse	- 32 -
5.1. Etablierung des Adhäsionstests an Endothelzellen mit PBMC	- 32 -
5.1.1. Standardkurve zur Bestimmung der Anzahl an PBMC	- 32 -
5.1.2. Adhäsionstest	- 32 -
5.2. Etablierung des Adhäsionstests an Endothelzellen mit Thrombozyten	- 33 -
5.4.1. Zelldichte	- 38 -
5.4.2. Biochemische Aktivität	- 39 -
5.4.3. Interleukin 6 Sekretion	- 40 -
5.4.4. PBMC-Adhäsion	- 41 -
5.4.5. Prostacyclinsekretion	- 43 -
5.4.6. Thrombozytenadhäsion	- 44 -
5.5. Verbesserung der Proliferationseigenschaften von HSVEC auf Rinderperikard mittels Fibroblasten preseeding	- 45 -
5.6. Histologische und Immunhistochemische Darstellung von Fibroblasten und Endothelzellen auf Rinderperikard	- 46 -
5.7. Vergleich zellulärer Funktionsparameter von direkt auf Rinderpericard adhären- ten Endothelzellen mit Endothelzellen auf Rinderpericard n. preseeding mit Fibroblasten-	- 49 -
5.7.1. PBMC-Adhäsion	- 51 -
5.7.2. Thrombozytenadhäsion	- 52 -
5.7.3. Prostacyclinsekretion	- 54 -

6. Diskussion	- 55 -
7. Zusammenfassung	- 64 -
8. Ausblick	- 65 -
9. Literatur	- 66 -
10. Publikationen aus der Arbeit	- 75 -
11. Danksagung	- 86 -
12. Curriculum vitae	- 87 -

1. Einleitung

Cardiovaskuläre Erkrankungen verursachen weltweit ein Drittel aller Todesfälle und repräsentieren damit die häufigste Todesursache. Dies ist nicht länger auf industrialisierte Länder beschränkt, laut Schätzungen der WHO werden im Jahr 2010 auch in Schwellen- und Entwicklungsländern cardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache darstellen (WHO 2006). Dies weist auf eine künftig zu erwartende erhebliche Zunahme bezüglich Inzidenz und Prävalenz dieser Erkrankungsgruppe hin.

Operatives Eingreifen in den Krankheitsverlauf cardiovaskulärer Erkrankungen ist in einer Vielzahl der Fälle erforderlich. Bei den in diesem Zusammenhang durchgeführten Eingriffen wird häufig Fremdmaterial implantiert, darunter fallen Bypass-Gefäße, Gefäßpatches und Herzklappenprothesen.

Aufgrund der bereits erwähnten Zunahme cardiovaskulärer Erkrankungen ist ein vermehrter Bedarf an cardiovaskulären Prothesen zu erwarten. Am Beispiel der Herzklappenprothesen wurde von Yacoub et al eine Zunahme von weltweit 290 000 implantierten Prothesen im Jahr 2003 auf über 850 000 im Jahr 2050 geschätzt (Yacoub MH 2005).

Grundvoraussetzung cardiovaskulärer Prothesen, sowie aller temporär oder permanent implantierten Fremdmaterialien ist neben ihrer Funktionalität ausreichende Biokompatibilität, die gewährleistet den Patienten durch das Fremdmaterial nicht zu schädigen.

Bezüglich cardiovaskulärer Prothesen ist der Begriff der Biokompatibilität in drei Faktoren zu untergliedern und zu definieren.

Fehlende oder geringgradige Toxizität ist Voraussetzung aller Fremdmaterialien im klinischen Gebrauch. Hierunter fällt vor allem das Fehlen mutagenen Potentials, sowie eine möglichst geringe lokale und systemische Toxizität des implantierten Materials.

Histokompatibilität beschreibt die Reaktion des das Fremdmaterial umgebenden Gewebes auf selbiges. Hier ist eine möglichst geringe inflammatorische Lokalreaktion, sowie eine gute Inkorporation in das umliegende Gewebe wünschenswert.

Die Haemokompatibilität stellt das für cardiovaskuläre Prothesen spezifischste Merkmal dar. Haemokompatibilität wurde als die Unfähigkeit von Fremdoberflächen das Gerinnungssystem zu aktivieren oder Thrombozyten, Leukozyten oder Erythrozyten an ihrer Oberfläche zu adhären beziehungsweise zu verändern definiert (Seyfert U 1995).

Die ideale cardiovaskuläre Prothese vereinigt neben der eben angeführten Biokompatibilität noch eine Vielzahl weiterer Eigenschaften, die jedoch zu einem großen Teil direkt oder indirekt mit der Biokompatibilität des Materials verbunden sind, auf sich und ist bisher nicht

verfügbar. So müsste diese Prothese eine ideale Hämodynamik bieten und gegen Infektionen resistent sein, im besten Falle mittels des körpereigenen Immunsystems. Die Haltbarkeit sollte von lebenslanger Dauer sein und die Möglichkeit zu Reparatur beziehungsweise Regeneration bei etwaigen Schädigungen der Prothese gegeben sein. Weiterhin sollte kein Risiko für die Übertragung von Krankheiten gegeben sein, wie dies bei der Implantation von allogenen oder xenogenen Material nicht auszuschliessen ist (Hoerstrup SP 2004). Antikoagulation sollte nicht notwendig sein und auch störende Nebengeräusche, die bei mechanischen Herzklappen auftreten können, vermieden werden. Als weitere Eigenschaften wären einfache Implantationstechnik, unbegrenzte Verfügbarkeit und möglichst geringe Kosten anzuführen.

Tabelle 1 (Haverich A 2005) gibt am Beispiel von Herzklappenprothesen eine Übersicht über die besprochenen Eigenschaften aktueller und idealer Materialien.

Eigenschaften	Biologisch (xenogen)	Technisch	Homograft	Idealer Ersatz
Autologes Gewebe	-	-	-	+
Infektionsrisiko	-	-	+	+
Übertragungsrisiko von Erkrankungen	(-)	+	(-)	+
Antikoagulation	+	-	+	+
Haltbarkeit	5-10 Jahre	>25 Jahre	5-15 Jahre	Lebenslang
Wachstumspotential	-	-	-	+
Regeneration	-	-	-	+
Hämodynamik	(+)	+/-	+	+
Verfügbarkeit	+	+	-	+
Kosten	+/-	+/-	-	+
Geräusche	+	-	+	+
Implantationstechnik	+/-	+	-	+

Tab.1

Wie in obiger Tabelle dargestellt, werden cardiovaskuläre Prothesen in solche aus technischen Material, sowie Prothesen aus biologischen Material unterschieden. Technische Materialien bieten den Vorteil einer nahezu unbegrenzten Haltbarkeit, wodurch die Notwendigkeit von Reoperationen verringert wird. Nachteilig wirkt sich jedoch aus, dass technische Materialien

im erheblichen Masse thrombogen wirken, dies macht eine dauerhafte Antikoagulation der Patienten mit dem Risiko von Blutungen notwendig (Emery R 2005, Cannegieter SC 1994). Biologische Materialien dagegen zeichnen sich durch eine im Vergleich zu technischen Materialien geringere Thrombogenität aus. Eine dauerhafte Antikoagulation ist dadurch vermeidbar. Jedoch sind biologische Materialien auf Grund strukturellen Versagens von begrenzter Haltbarkeit. So kommt es bei circa 50% der implantierten Schweine-Aortenklappen innerhalb von 15 Jahren zu strukturellem Versagen (Hammermeister K 2000, Schoen FJ 1999). Ursache dieser begrenzten Haltbarkeit ist eine progrediente Verkalkung. Dieser wiederum liegen Fixierungsschritte bei der Bearbeitung der Prothese (Grabenwoger M 1996, Levy RJ 1986), Inflammation und Immunogenität (Simon P 2003), sowie Risikofaktoren von Seiten des Patienten (Schinke T 1999, Farivar RS 2003, David TE 2003) zugrunde.

Tissue Engineering ist ein Begriff, der den Versuch beschreibt lebende Gewebe und Organe im Labor herzustellen. Motivation für dieses Bestreben ist die Notwendigkeit, Gewebe zu ersetzen, die entweder durch Krankheit oder Trauma verloren oder aufgrund gestörter Embryogenese nicht ausreichend entwickelt wurden. Das grundsätzliche Prinzip besteht in der Gewinnung autologer Zellen, die in vitro vermehrt, auf eine Matrix, dem sogenannten Scaffold, ausgebracht und in den Patienten implantiert werden. In vivo, also nach der Implantation, sollen die autologen Zellen einerseits eine Neomatrix entwickeln, andererseits sollen sie das Scaffold abbauen, um so schließlich ein vollständig autologes, lebendes Implantat zu bilden (Hoerstrup SP 2004).

Ein Vergleich der oben beschriebenen Problematik der Fremdmaterialien mit Ansatz und Ziel des Tissue Engineering legt die cardiovaskuläre Prothetik als Betätigungsfeld dieser Disziplin nahe. Ziel cardiovaskulären Tissue Engineerings ist die ideale Hämokompatibilität durch autogenes Endothel auszunutzen, die Möglichkeit zu Regeneration und im idealen Falle sogar Wachstum durch Proliferation autologer Zellen sowie Umbau Extrazellulärer Matrix wahrzunehmen und mittels intakten Endothel und dessen Interaktion mit dem Blut eine aktive, körpereigene Immunabwehr zu erhalten. Im Besonderen wird mittels Tissue Engineering versucht Lösungsmöglichkeiten für bisher nicht oder nicht zufriedenstellend lösbare Probleme zu finden. Hierunter fallen kleinlumige Gefäße für die cardiale oder periphere, distale Bypasschirurgie, sowie Herzklappen und patches mit Wachstumspotential für die Kinderherzchirurgie.

Ein weiteres Ziel ist die Verbesserung bereits vorhandener Prothesen mit guten Ergebnissen, wie dies in der Herzklappenchirurgie bei Erwachsenen der Fall ist.

Bezüglich des Tissue Engineerings in der kardiovaskulären Chirurgie wurden schon viele Wege, auch mit einigen Abweichungen von dem beschriebenen Grundkonzept beschritten. Zunächst wurden bei der Wahl des Scaffolds, die am Anfang jeden Tissue Engineering Prozesses steht, verschiedene Lösungsmöglichkeiten gesucht. Künstliches degradierbares Material hat den Vorteil, dass es in vivo komplett abbaubar ist und so ein vollständig autologes Implantat entsteht. Ein erheblicher Nachteil ist jedoch, dass diese Polymere meist sehr steif und somit schlecht formbar sind (Flameng W 2004).

Ein weiteres Problem besteht darin, dass die Implantate sofort funktionieren müssen, also keine Zeit für in vivo Umbau zwischen Implantation und Funktionsaufnahme zur Verfügung steht. Dies hat zur Folge, dass alle bisherigen mit degradierbaren Scaffold hergestellten Prothesen für den kleinen Kreislauf bestimmt waren, da diese Konstrukte der durch die Hämodynamik des systemischen Kreislaufs entstehenden mechanischen Belastung nicht gewachsen sind (Hoerstrup SP 2004).

Eine weitere Möglichkeit stellen biologische xenogene und allogene Materialien dar. Diese müssen jedoch, um eine immunogene Reaktion zu vermeiden und um Stabilität zu gewinnen, dezellularisiert und mit Glutaraldehyd quervernetzt werden, eine Behandlung, die das Wachstumspotential unterdrückt und auf Grund ihrer Toxizität ein reseeding mit autologen Zellen erheblich erschwert. Dennoch stellen diese Materialien auf Grund ihrer klinischen Anwendbarkeit zur Zeit das Scaffold der Wahl dar (Stock U 2006).

Im nächsten Schritt muss die Wahl der Zellen geklärt werden, anzustreben sind für kardiovaskuläre Prothesen Fibroblasten, beziehungsweise Myofibroblasten, die durch die Synthese extrazellulärer Matrix zur Stabilität beitragen, sowie Endothel zur Verbesserung der Haemokompatibilität. Eine meist gut zu erreichende Quelle ist die Vena Saphena Magna (Mol A 2004), aber auch Stamm- und Progenitorzellen gewonnen aus verschiedenen Quellen stellen ein attraktives Konzept dar (Sutherland F 2005).

Ein weiterer zu bearbeitender Punkt sind Zeitpunkt und Technik der Besiedelung mit Zellen. Soll das Material in vitro besiedelt werden oder soll versucht werden das Scaffold so zu präparieren, dass sich die gewünschten Zellen in vivo darauf ansiedeln. Diese Vorgehensweise wird als Tissue Guided Regeneration bezeichnet (Haverich A 2005). Bezüglich des Tissue Guided Regeneration hat sich jedoch gezeigt, dass eine spontane in vivo Endothelialisierung zwar im Tiermodell zu verwirklichen, bei Menschen jedoch sehr fragwürdig ist (Stock U 2006, Haverich A 2005, Simon P 2003).

Die in vitro Besiedelung wiederum ist mit erheblichen technischen Schwierigkeiten bezüglich gleichmäßiger Zelldichte und Zellverlust bei der Besiedelung behaftet (Sutherland F. 2003).

Dennoch erscheint derzeit die *in vitro* Besiedelung xenogener Materialien der vielversprechendste Weg zu sein, jedoch weist auch dieser Probleme auf, insbesondere bezüglich der Retention der Zellen unter Flussbedingungen (Flameng W 2004), sowie bezüglich der Interaktion autologer Zellen und Blutbestandteile mit dem Fremdmaterial.

Tissue Engineering stellt ein vielversprechendes Feld zur Verbesserung der Implantate in der kardiovaskulären Chirurgie dar. Allerdings ist es auch mittels Tissue Engineering bisher nicht gelungen die ideale Lösung für kardiovaskuläre Prothesen zu finden. Somit sind noch viele Fragen bis zur Verwirklichung der vollständig autologen kardiovaskulären Prothese zu beantworten.

2. Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit werden, ausgehend von der Annahme der maximalen Hämokompatibilität durch Endothel, Biomaterialien aus der klinischen Anwendung der cardiovascularen Chirurgie auf ihr Endothelialisierungspotential hin untersucht.

Weiterhin wird das auf Biomaterial adhärente Endothel auf seine Funktion untersucht, um die Kompatibilität zwischen Material und autologer Zelle weiter abzuklären und um festzustellen, ob das erhaltene Endothel tatsächlich günstige Eigenschaften bezüglich der Hämokompatibilität aufweist.

Schließlich soll geklärt werden, welchen Einfluss ein zweischichtiges Besiedelungsmodell mit (Myo)Fibroblasten gefolgt von Endothelzellen auf die endotheliale Funktion hat.

3. Materialien

3.1. ELISAs und Antikörper:

Biotynlierter Anti-Maus Antikörper *Dianova* (Hamburg)

Anti-Human von Willebrand Factor, IgG Fraction of Antiserum developed in Rabbit
Sigma (Saint Louis, USA)

Monoclonal Anti Vimentin Clone V9 *Sigma* (Saint Louis, USA)

IL-6 IEMA Jumbo, 5 x 96 Tests:

Beckman-Coulter (Krefeld)

6-keto Prostaglandin F1 α EIA Kit

Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)

Vectastain Elite ABC Kit *Vector Laboratories*

3.2. Geräte und Messapparatur:

β -Counter: Wallac MicroBeta[®] TriLux 1450 Microbeta Liquid Scintillation & Luminescence Counter *PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc.* (Boston, USA)

Brand Transferpette[®] 8 (30-300 μ L): *Brand GmbH* (Wertheim)

Brutschrank CO₂-Auto-Zero: *Haraeus Holdings GmbH* (Hanau)

CASY[®] Cell Counter and Analyser System, Model TTC: *Schärfe Systems GmbH* (Reutlingen Germany)

Cell-Harvester: Harvester for MicroBeta IH-110-96WS Harvester 96:

Inotech AG or Inotech Encapsulation AG (Dottikon, Schweiz)

Critical Point Dryer 030: *Bal-Tec Ag* (Liechtenstein)

Einbettautomat *Shandon Inc.* (Waltham, MA USA)

E-max Precision Microplate Reader: *Molecular Devices Corporation* (Sunnyvale, CA USA)

Eppendorf Multipette Plus: *Eppendorf Deutschland GmbH* (Wesseling-Berzdorf)

Eppendorf Reference 10 μ L: *Eppendorf Deutschland GmbH* (Wesseling-Berzdorf)

FACSCalibur System: *Becton/Dickinson GmbH* (Heidelberg)

Gilson-Pipetten (20,100, 200, 1000 μ L): *Gilson* (Villiers Le Bel, Frankreich)

Knick Lab-pH-Meter Digital: *Elscolab* (Utrecht, Niederlande)

Kryobox: *Air Liquide* (Paris, Frankreich)

Labsystems Finnpipette[®] 1500 μ L: *Molecular Devices Corporation* (Sunnyvale, CA USA)

Liquid Scintillation Counter 1414 Winspectral: *PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc.* (Boston, USA)

Mikroskop Fluovert FU: *Leitz GmbH* (Wetzlar)

Pipetboy acu: *Integra Biosciences GmbH* (Fernwald)

Rasterelektronenmikroskop FEI Quanta 400: FEI Company Hillsboro Oregon USA

Rotationsmikrotom Microm international GmbH (Walldorf)

Rüttelplatte Typ VX7: *Janka-und-Kunkel AG* (Köln)

Rüttler JKA Vibrax-VXR: *Janka-und-Kunkel AG* (Köln)

Sterilbank Hera safe Heraeus®: *Heraeus Holdings GmbH* (Hanau)

Sterilbank Laminair Heraeus®: *Heraeus Holdings GmbH* (Hanau)

Stups: *Provac* (Balzers)

Vortex Mixer: *National Laboratory®* (Richland, USA)

Wallac 1420 Victor 3TM plate reader: *PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc.* (Boston, USA)

Waage von Sartorius BP2215 (max. 220 g, d = 0,1mg): Sartorius AG (Göttingen)

Zentrifuge Megafuge 1.0 R Heraeus Systems Sepatech: *Heraeus Holdings GmbH* (Hanau)

3.3. Verbrauchsmaterialien:

6-Well Platten, steril: *Greiner Labortechnik* (Frickenhausen)

96-Well Platten, steril: *Nunc* (Roskilde, Dänemark)

96-Well Platten, unsteril: *M&B Stricker* (Oberschleißheim)

96-Well Platten, unsteril: *Nunc* (Roskilde, Dänemark)

BSA: bovines Serumalbumin, Fraction V: *PAA Laboratories GmbH* (Linz, Austria)

Falcon-Röhrchen, steril: *Nunc* (Roskilde, Dänemark)

Filtermat A, GF/C, 100 per Package: *PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc.* (Boston, USA)

Gentamycin: *PAA Laboratories GmbH* (Cölbe), verwendete Konzentration: 50 µg/mL Gelatine/HEPES

Kryogefäße 2mL: *Carl Roth GmbH & Co. KG* (Karlsruhe)

Metallringe: *Physikalische Mechanische Werkstatt der Universität Regensburg*

Gewebestanze: *Physikalische Mechanische Werkstatt der Universität Regensburg*

[methyl-³H-]Thymidin, spezifische Aktivität 74 Gbq/mmol:

verwendete Konzentration in Well 0,5µCi/mL *Amersham Pharmacia Biotech UK Limited* (Buckinghamshire, UK)

Monovette EDTA KE/ 9ml: *Sarstedt* (Nümbrecht)

Monovette Citrat 5ml: *Sarstedt* (Nümbrecht)

Objektträger Super Frost Plus *Menzel Gmbh* (Braunschweig)

Polypropylene Round Bottom Tube: *Nunc* (Roskilde, Dänemark)

Sterilfilter BD Falcon Bottle-Top Filter, 0.22 µm filter pore size, cellulose nitrate membrane (Individually packed): *Becton/Dickinson GmbH* (Heidelberg)

T-25-Kulturflaschen: *Cellstar, Greiner Bio-One GmbH* (Frickenhausen)

T-175 Kulturflaschen: *Cellstar, Greiner Bio-One GmbH* (Frickenhausen)

Nicht einzeln gelistet wurden:

Verschiedene Eppendorf-Cups, Pipettenspitzen und sterile Falcon-Röhrchen.

3.4. Zellkulturmedien und Lösungen

Das Zellkulturmedium setzte sich aus einer Mischung von 30% gepooltem Humanserum (Spenderblutgruppe O⁺) und 70% Endothelial Cell Basal Medium¹ plus Supplement Pack² der Firma PromoCell® zusammen. Das Spenderserum wurde aus Spenderblut von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Klinikums gewonnen, die zum Zeitpunkt der Entnahme nach eigener Aussage nicht an einer infektiösen Erkrankung litten.

Die Zusammensetzung der Mischung von Endothelial Cell Basal Medium und Endothelial Cell Growth Medium (= Supplement-Pack) sowie nach Zusatz von gepooltem Humanserum im Verhältnis 7:3 ist wie folgt:

Substanz	Konzentration vor Mischung mit gepooltem Humanserum	Konzentration ³ nach Mischung mit gepooltem Humanserum
Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin (ECGS/H)	0,4%	0,28%
Fetales Kälberserum (FCS)	2%	1,4%
Human Epidermal Growth Factor (hEGF), rekombinant	0,1 ng/mL	0,07 ng/mL
Hydrocortison	1 µg/mL	0,7 µg/mL
Human Basic Fibroblast Growth Factor (hbFGF), rekombinant	1 ng/mL	0,7 ng/mL
Amphotericin B	50 ng/mL	35 ng/mL
Gentamycin	50 µg/mL	35 µg/mL
Gepooltes Humanserum	0%	30%

Tab. 1

¹ **Endothelial Cell Basal Medium:** Promo Cell® (Heidelberg), Best. Nr.: C-22210

² **Supplement Pack/Endothelial Cell growth medium:** Promo Cell® (Heidelberg), Best. Nr.: C-39210

³ Die Konzentrationen der Substanzen sind rein rechnerische Werte aus der Mischung des Endothelial Cell Basal Medium plus Supplement Pack mit dem gepoolten Humanserum, wobei die Konzentration der Substanzen in diesem gepoolten Humanserum keine Berücksichtigung findet.

Zum Waschen der Zellen wurde PBS nach Dulbecco mit folgender Zusammensetzung und einem pH von 7,3 bis 7,4 verwendet:

Substanz	Konzentration [g/L]
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,133
KCl	0,2
KH ₂ PO ₄	0,2
MgCl ₂ 2H ₂ O	0,1
NaCl	8,0
Na ₂ HPO ₄	1,15

Tab. 2

3.5. Weiterhin benötigte Medien und Lösungen:

Aceton: Merck (Darmstadt)

Aceton/Methanol: 1:1, beide Komponenten von Merck (Darmstadt)

Calcein Am 1 mg/mL solution in anhydrous DMSO: Molecular Probes Inc. (Eugene, USA)

CASY@ton Messlösung, 10L: Schärfe System GmbH (Reutlingen)

CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS): Promega (Madison, WI USA)

Citronensäuremonohydrat: Merck (Darmstadt)

Cryomedium 1: Medium (s.o.) 90%, HEPES (s.o.) 10%

Cryomedium 2: Medium (s.o.) 70%; HEPES (s.o.) 10%, DMSO (= Dimethylsulfoxid) 20%

D+ Glukose Monohydrat: Merck (Darmstadt)

Diaminobenzidin: Sigma Aldrich (München)

Entellan mikroskopisches Eindeckmittel: ProSciTech (Kirwan, Australia)

Ficoll-Paque™ PLUS: Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)

Gelatine: Merck (Darmstadt), verwendete Konzentration: 0,25% in HEPES

HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure-Puffer (1M):

Biochrom AG (Berlin)

Kollagenase Typ 2, dialysiert:

PAA Laboratories GmbH (Cölbe), applizierte Konzentration 0,1 U/mL

Paraformaldehyd: Merck (Darmstadt)

RPMI-1640 Medium: PAN Biotech GMBH (Aidenbach)

Thrombin: Sigma-Aldrich (München)

TNF α , human rekombinant (aus E. coli, lyophilisiert, proteinträgerfrei):

tebu-bio GmbH (Offenbach), verwendete Konzentration 10 nmol/L

Trypsin (1:250) 10fach 2,5% Trypsin:

PAA Laboratories GmbH (Cölbe), verwendete Verdünnung 0,25% Trypsin (= 1fach)

Trypsin-Mix: 1 Teil 0,5M EDTA (pH = 8), 1 Teil Trypsin (10x), 2 Teile PBS (nach Dulbecco s.o.)

4. Methodik

4.1. Zellkultur

Für die Versuche wurden humane Endothelzellen der Vena Saphena Magna und humane aortale Fibroblasten verwendet. Die Endothelzellen stammen aus nicht benötigten Venensegmenten von Patienten, die sich einer Operation zum Aortokoronaren Venen-Bypass unterzogen, die Fibroblasten aus im Rahmen von Herztransplantationen explantierten Aortensegmenten. Die Experimente erfolgten unter Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg.

4.1.1. Isolierung humaner Vena Saphena Magna Endothelzellen (HSVEC)

Die Segmente der Vena Saphena Magna werden mittels einer Knopfkanüle intubiert, nachdem die Kanüle mit einem Faden auslaufdicht befestigt ist, wird das Gefäß zum Entfernen von Blut einmal mit 50 ml PBS durchgespült und anschliessend das freie Gefässende mit einer Gefässklemme verschlossen. Zur Ablösung des Endothels von der subendothelialen Matrix wird die Vene mit 0,0125 % ger Kollagenase⁴ für 25 Minuten bei 37 ° C inkubiert und anschliessend die abgelösten Endothelzellen mit 50 ml PBS in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gespült in das zur Inaktivierung der Kollagenase 1 ml FCS vorgelegt ist. Die Endothelzellen werden daraufhin bei 1200 Umdrehungen pro Minute (UPM) 5 Minuten zentrifugiert⁵, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in HSVEC Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen werden nun in 5 ml HSVEC-Medium in einer mit 0,2 % iger Gelatine beschichteten T-25 Kulturflasche⁶ ausgesät und bei 37 ° C inkubiert. Nachdem die Endothelzellen zu einem konfluenten Monolayer gewachsen sind werden sie mittels 5 minütiger Inkubation mit Kollagenase abgelöst und in HSVEC-Medium mit 10 % Dimethylsulfoxid in flüssigen Stickstoff eingefroren. Dazu wurden Aliquots mit etwa 5×10^5 Zellen nach Zentrifugation bei 1200 UPM in Cryoröhrchen mit eisgekühlten Cryomedium 1(s.o.) überführt. Nach 30 min. wurde Cryomedium 2(s.o.) zugegeben, die Röhrchen in eine mit Isopropanolol gefüllte Kryobox transferiert und bei -80°C eingefroren. Etwa 24h später erfolgte der Transfer der Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff mit einer Temperatur von -180°C.

⁴ **Kollagenase Typ 2, dialysiert:** PAA Laboratories GmbH (Cölbe), applizierte Konzentration 0,1 U/mL

⁵ **Zentrifuge Megafuge 1.0 R** Heraeus Systems Sepatech: Heraeus Holdings GmbH (Hanau)

⁶ **T-25-Kulturflaschen:** Cellstar, Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)

4.1.2. Isolierung humaner aortaler Fibroblasten (HAF)

Das Prinzip der Isolierung entspricht dem der Isolierung von HSVEC, mit dem Unterschied, dass die Inkubation mit Kollagenase offen in einer Petrierschale durchgeführt wird. Die Reinheit der Fibroblasten, beziehungsweise der Anteil an Endothelzellen, wird mittels FACS-Analyse bestimmt (siehe 3.1.4)

4.1.3. Kultivierung der Endothelzellen und Fibroblasten

Für die Experimente wurden die Zellen bei 37 ° C im Wasserbad ca. 2 min. aufgetaut, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und zum Auswaschen des Dimethylsulfoxid nach Zugabe von 10 ml HSVEC-Medium 5 Minuten bei 1200 UPM zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in HSVEC-Medium resuspendiert und wie oben beschrieben auf eine T-25 Kulturflasche ausgebracht und inkubiert. Nachdem die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet haben, werden sie wiederum mit Kollagenase von der Kulturflasche abgelöst, wie oben beschrieben zentrifugiert und in 1 ml HSVEC-Medium resuspendiert. Die Konzentration der Zellen wird mittels eines Hämocytometers⁷ gemessen und mit HSVEC-Medium die für das Experiment benötigte Zellkonzentration hergestellt.

4.1.4. Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometer

Die Quantifizierung der Zellzahl erfolgte durch automatisierte Zellzählung mit dem Cell Account System (CAS^Y⁸) von Schärfe Systems GmbH.

Diese Methode der Zellzählung basiert auf der Kombination von Verfahren aus dem Bereich der Partikelmesstechnik. Hierbei findet eine Widerstandsmessung sowie eine Pulsflächenanalyse statt. Die Zellen werden in schwachen Elektrolyten suspendiert und durch eine Messpore in eine Kapillare gesaugt. In der Folge kommt es durch die Zellen zu einer Widerstandserhöhung in der Kapillare. Diese Impedanzenerhöhung ist ein Maß für das Zellvolumen, wobei das Abtasten des Signals mit einer Frequenz von 1 MHz erfolgt. Über die Programm-Software erfolgt die Integration des gesamten Messsignals

Einzelschritte zur Bestimmung der Zellzahl auf 96-Well Platten:

⁸ CASY® Cell Counter and Analyser System, Model TTC: Schärfe Systems GmbH (Reutlingen Germany)

1.	Absaugen des Mediums (150 µl/well) aus den 96-Well Platten
2.	Waschen mit PBS (200 µl/well)
3.	Absaugen des PBS
4.	Ablösen der Zellen: Zugabe von Kollagenase Konzentration 0,1 U/mL (50 µl/well)
5.	Inkubation bei 37°C; 5% CO ₂ für 3-5 min. im Brutschrank
6.	Kontrolle des Ablösevorgangs mittels Lichtmikroskop (eventuell erneute Inkubation)
7.	Abstoppen der Proteaseaktivität der Kollagenase: Zugabe von Medium 100 µl/well (Proteaseinhibitoren)
8.	Lagerung der Zellen in den 96-Well-Platten auf Eis
9.	Resuspendieren von 100 µl/well
10.	Zugabe der Zellsuspension in 5 ml Casyton ⁹ (Verdünnung 1:51)
11.	Mischen
12.	Bestimmung der Zellzahl und der Zelldimensionen (Durchmesser, Volumen)

Tab. 3

4.1.5. Reinheitsbestimmung mittels CD31-Färbung

Zur Abschätzung der Reinheit der Kulturen wurden die Zellen mit einem endothelzellspezifischen Antikörper (anti-human CD31¹⁰) markiert und der Anteil positiver Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

¹⁰ **Monoclonales anti-human CD31 (PECAM-1)/R-PE Maus IgG** Ancell Immunology research products (Bayport, USA)

Einzelschritte zur Reinheitsbestimmung mittels CD31 Färbung

1.	Ablösen der Zellen wie unter 3.1.4 beschrieben
2.	Zellzählung mittels Casy
3.	Überführen von Aliquots zu 50000 Zellen inFACS Röhrchen
4.	Zentrifugation mit 1200 rpm bei 4°C
5.	Absaugen des Überstandes bis auf 100 µl
6.	Zugabe des CD31 Antikörpers
7.	Inkubation für 30 min. im Brutschrank
8.	3 Waschriffe mit PBS/BSA und anschliessender Zentrifugation
9.	Messung im FACS-Gerät entsprechend dem Standardprotokoll

Tab. 4

Für die Versuche wurden nur Kulturen mit Reinheiten > 95% verwendet.

4.2. Bearbeitung der Biomaterialien

4.2.1 Vorbereitung der Probenstücke

Die zu bearbeitenden Materialien wurden vor der Bearbeitung 3 mal 5 min. in steriler isotoner Kochsalzlösung gewaschen, danach mittels einer Gewebestanze¹¹ in 0,3 cm² grosse Plättchen gestanzt, in 96-Well-Platten¹² überführt und dort mit Metallringen¹³ fixiert.

Liste der bearbeiteten Materialien:

Shellhigh No-React® VascuPatch™ (NR)

Carpentier-Edwards Perimount Plus Perikard-Bioprothese (Glutaraldehyd fixiertes Rinderperikard)

Carpentier-Edwards Mitral Porcine Bioprosthesis (Glutaraldehyd fixierte porcine Mitralklappe)

Porcine Aortenklappe in Vodka aufbewahrt

¹¹ Gewebestanze: Physikalische Mechanische Werkstatt der Universität Regensburg

¹² 96-Well Platten, steril: Nunc (Roskilde, Dänemark)

¹³ Metallringe: Physikalische Mechanische Werkstatt der Universität Regensburg

4.2.2. Aussaat von HSVEC/HAF auf den Proben

Vor der Aussaat wurden die Biomaterialien mit HSVEC-Medium, für 20 min. bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben von den Kulturflaschen abgelöst und auf eine Konzentration von 120 000 Zellen pro ml, bei hyperkonfluenter Aussaat, beziehungsweise 30 000 Zellen pro ml (hypokonfluente Aussaat). Medium gebracht. Davon wurden 150 µl auf jede Probe ausgebracht, so dass die Zellzahl pro cm² 60 000 (hyperkonfluent) beziehungsweise 15 000 (hypokonfluent) Zellen betrug.

4.2.3. Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird Elektronen-Strahlung von einer beheizten Kathode generiert, und nach Bündelung mittels eines von einem Kondensator erzeugten elektrischen Feldes die Oberfläche des Objekts Punkt für Punkt mit dem gebündelten Elektronenstrahl beschossen. Beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf das Objekt werden die Elektronen gestreut und diese gestreuten Elektronen von einem Detektor registriert. Nach Verstärkung des Signals wird es auf einer Bildröhre abgebildet, so dass Punkt für Punkt ein Bild der Oberfläche des Objekts entsteht. Da sich das Objekt elektrisch aufladen würde, muss es, um dies zu verhindern, leitend sein, dies wird durch eine Bedampfung mit Gold erreicht. Weiterhin muss das Objekt Wasser- und Lösungsmittelfrei sein. Da sonst die in den Objekten enthaltene Flüssigkeit beim Eintreten in das Vakuum des REM explosionsartig verdampfen würde, was die Zerstörung der Objekte zur Folge hätte. Dies wird erreicht, indem die Proben zunächst in einer Alkoholreihe steigender Konzentration entwässert werden und schliesslich mittels der Kritisch-Punkt-Trocknung der restlichen Flüssigkeit entzogen werden. Die Kritisch-Punkt-Trocknung ist bei der Bearbeitung biologischer Materialien von besonderer Bedeutung, da deren Oberfläche durch die bei Lufttrocknung auftretende grosse Oberflächenspannung zerstört werden würde. Die Kritisch-Punkt-Trocknung nutzt aus, dass oberhalb der für eine Verbindung kritischen Temperatur diese nur noch in der Gasphase vorliegen kann. Erhitzt man über diese kritische Temperatur und entzieht daraufhin den Druck, vermeidet man das gleichzeitige Vorliegen von Flüssigkeits- und Gasphase und damit das Auftreten von grosser Oberflächenspannung. Die Proben werden zunächst in einen Präparatkorb überführt und dieser mit Überführungsflüssigkeit (Aethanol absolut) gefüllt, im Kritisch-Punkt-Apparat wird diese Überführungsflüssigkeit durch die Übergangsflüssigkeit (CO₂) ersetzt. Daraufhin wird das Gerät geheizt. Bei einer Temperatur von 31°C und einem Druck von 73,8 bar geht das CO₂ in die Gasphase über. Nach weiteren Erhitzen auf 40 °C (p

= 80 bar) wird das Gas ausgelassen, bei Erreichen von Atmosphärendruck kann der Präparatkorb entnommen werden. Die so getrockneten Präparate werden mittels Klebefolie auf Stubs fixiert und auf den Probenhalter aufgebracht. Anschliessend erfolgt die Bedampfung mit Gold. Danach sind die Präparate lagerungsfähig und für die REM vorbereitet.

Einzelschritte der Probenvorbereitung:

1.	Auswaschen des HSVEC Mediums mit PBS
2.	Fixieren der Proben mit 4 % Paraformaldehyd ¹⁴ für 20 min. bei Raumtemperatur
3.	Auswaschen des Paraformaldehyds mit PBS
4.	Entwässern mittels Alkoholreihe (30, 50, 70, 80 ,90 ,96 %) für jeweils 2 h, Wechsel des Alkohols nach 1h
5.	Überführen der Proben in den Präparatekorb, Zugabe von Äthanol absolut (Überführungsflüssigkeit)
6.	Präparatekorb in die Proben-Druckkammer ¹⁵ einsetzen, diese verschliessen und mit Überführungsflüssigkeit füllen
7.	Kühlen der Probedruckkammer auf 10°C
8.	Einlassen der Übergangsflüssigkeit (CO ₂) in die Probedruckkammer
9.	Einschalten des Magnetührers zur besseren Durchmischung der beiden Medien
10.	Ablassen des Mediengemisches, bis die Proben nur noch knapp bedeckt sind
11.	Wiederholen dieses Vorgangs bis die Überführungsflüssigkeit vollständig durch die Überführungsflüssigkeit ersetzt ist (6–8 mal)
12.	Füllen der Probedruckkammer mit CO ₂
13.	Kühlung und Magnetührer ausschalten
14.	Heizung einschalten
15.	Bei 40°C Öffnen des Auslassventils und langsames Ablassen des Gases bis auf Atmosphärendruck
16.	Öffnen der Probedruckkammer und Entnahme des Präparatekorbs
17.	Fixieren der Proben auf Stubs ¹⁶
18.	Bedampfen der Proben
19.	Lagerung im Exsiccator

Tab. 4

¹⁴ Paraformaldehyd: Merck (Darmstadt)

¹⁵ Critical Point Dryer 030: Bal-Tec Ag (Liechtenstein)

¹⁶ Stubs: Provac (Balzers)

4.2.4. Bestimmung der Zellzahl auf biologischen Material mittels

Rasterelektronenmikroskopie

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden REM–Aufnahmen der mit HSVEC besiedelten Materialien in 1500facher Vergrößerung verwendet. Am PC wurde mittels frei erhältlicher Bildbearbeitungs–Software¹⁷ ein Raster mit einer Feldgröße von 320 µm²(Maßstab der REM –Aufnahme) über die Aufnahmen gelegt. Daraufhin wurden die Zellgrenzen innerhalb der der Felder markiert und ausgezählt. Es wurden so 10 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder von zwei Untersuchern unabhängig voneinander bearbeitet und der Mittelwert ± Standardabweichung der pro Gesichtsfeld gezählten Zellen gebildet.

4.2.5. Immunhistochemie

Die histologisch zu untersuchenden Proben wurden in Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und anschliessend gefärbt. In der Immunhistochemischen Untersuchung wurden ein Antikörper gegen den von Willebrand Faktor zur Darstellung der Endothelzellen, sowie ein Vimentin Antikörper zur Darstellung von Fibroblasten eingesetzt. Zur Darstellung der gebundenen Antikörper wurde ein biotynlierter Anti–Maus–Antikörper, daraufhin Avidin und Diaminobenzidin(DAB) verwendet. Um die Peroxidase Aktivität des biologischen Materials zu vermindern wurde mit Wasserstoffperoxid vorinkubiert. Als Gegenfärbung wurde eine Hämatoxylin–Eosin(HE) Färbung eingesetzt.

Erstellen der Schnitte:

1.	Fixieren der Proben in 4% Paraformaldehyd
2.	Auswaschen des Paraformaldehyd mit PBS
3.	Paraffineinbettung und Ausgiessen im Einbettautomaten ¹⁸
4.	Schneiden in 5µm Schnitte mit dem Rotationsmikrotom ¹⁹
5.	Schnitte über Nacht bei 45°C auf Objektträgern ²⁰ trocknen
6.	Lagern bei 4°C

Tab. 5

¹⁷ GNU Image Manipulation Program

¹⁸ Einbettuomat Shandon Inc. (Waltham, MA USA)

¹⁹ Rotationsmikrotom Microm international GmbH (Walldorf)

²⁰ Objektträger Super Frost Plus Menzel GmbH (Braunschweig)

Einzelsschritte der immunhistochemischen Färbung

1.	Erwärmen der Schnitte für 5–10 min. bei 60°C
2.	Entparatfinieren mit Xylol 2 x 5 min.
3.	Alkoholreihe(100%, 95%, 70%), 5 min pro Konzentration
4.	Inkubation in 3% H ₂ O ₂ für 10 min
5.	Waschen 2 x 5 min. in PBS
6.	Antikörper(vWF ²¹ , Vimentin ²²) Inkubation für 1h bei Raumtemperatur
7.	Waschen mit PBS(3 x 5 min.)
8.	Inkubation mit biotynilierten Anti-Maus Antikörper ²³ für 45 min. bei Raumtemperatur
9.	Waschen mit PBS(3 x 5 min.)
10.	Zugabe von Avidin-Biotin-Complex ²⁴ für 45 min. bei Raumtemperatur
11.	Waschen mit PBS(3 x 5 min.)
12.	Zugabe von DAB ²⁵ (1,6 mg/ml) für 10 min.
13.	Waschen mit PBS(3 x 5 min.)
14.	Eindecken mit Entellan ²⁶

Tab. 6

¹⁸) Anti-Human von Willebrand Factor, IgG Fraction of Antiserum developed in Rabbit Sigma (Saint Louis, USA)

²² Monoclonal Anti Vimentin Clone V9 Sigma (Saint Louis, USA)

¹⁹ Biotynilierter Anti – Maus Antikörper Dianova (Hamburg)

²⁰ Vectastain Elite ABC Kit Vector Laboratories

²¹ Diaminobenzidin: Sigma Aldrich (München)

²². Entellan mikroskopisches Eindeckmittel: ProSciTech (Kirwan, Australia)

Einzelschritte der HE Färbung:

1.	Entparafinieren mit Xylol 2 x 5 min.
2.	Alkoholreihe(100%, 95%, 70%), 5 min pro Konzentration
3.	Waschen in Aqua dest.(3 x 5 min)
4.	Inkubation mit Meyers Hämatoxylin ²⁷ für 5 min.
5.	Waschen in Aqua dest.(3 x 5 min)
6.	Kurz waschen in 0,1% HCl in Alkohol(70%)
7.	Waschen in Aqua dest.(3 x 5 min)
8.	Inkubation in Leitungswasser für 10 min. zum bläuen der Kerne
9.	Waschen in Aqua dest.(3 x 5 min)
10.	Alkoholreihe(70%, 95%), 5 min pro Konzentration
11.	Inkubation mit Eosin ²⁸ in 1% alkoholischer Lösung für 10 min.
12.	Waschen mit 95% Alkohol
13.	Inkubation mit Xylol 2 x 10 min.
14.	Eindecken mit Entellan

Tab. 7

4.2.6. CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay

Der CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay testet die biochemische Aktivität von Zellen, indem das zugegebene Ausgangsprodukt (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-5-3-carboxymethoxyphenyl-2-4-sulfophenyl-2H-tetrazolium, kurz MTS-Tetrazolium) von den Mitochondrien der Zellen mittels NADPH oder NADH zu dem bei 490 nm absorbierenden MTS-Formazan reduziert wird. Die im Überstand gemessene optische Dichte ist direkt proportional zur Menge des umgesetzten MTS-Tetrazolium und somit ein Marker für die biochemische Aktivität von Zellen.

²⁷ Meyers Hämatoxylin Merck (Darmstadt)

²⁸ Eosin gelblich Merck (Darmstadt)

Einzelsschritte des CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay:

1.	Absaugen der Überstände der Wells
2.	Zugabe von 100µl HSVEC Medium + 20µl MTS Reagenz
3.	Inkubation 1h, 37°C, 5 % CO ₂
4.	Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 25µl 10 % SDS
5.	Überführen der Überstände auf eine neue 96 – Well Platte
6.	Messung der Absorbtion im ELISA reader bei 490nm

Tab. 8

4.2.7. Interleukin 6 ELISA

Interleukin 6 (IL-6) ist ein proinflammatorisches Zytokin , dass unter anderen von Endothelzellen sezerniert wird. Beim IL-6 ELISA²⁹ handelt es sich um einen Sandwich – ELISA. Die zu messenden Überstände werden in einer mit anti-human IL-6 Antikörpern beschichteten Multi-Well-Platte inkubiert. Nach Zugabe eines zweiten Acetylcholinesterase konjugierten IL-6 spezifischen Antikörpers (Konjugat) und dem Auswaschen nicht gebundener Antikörper wird ein bei 405 nm absorbierendes Chromogen (Acetylthiocholin und Natriumdithiobenzoat) zugegeben, die Absorbtion korreliert mit dem IL-6 Gehalt des Überstands. Bezüglich der erhöhten IL-6 Sekretion nach TNF α Stimulation wurde ein inflammatorischer Aktivierungsfaktor definiert.

Herstellung der Reagenzien für den IL-6 ELISA:

1. Auftauen der Komponenten bei Raumtemperatur
2. Verdünnung des Waschpuffers 1 : 20
3. Erstellen einer Standard Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen (1000;333;111;37;12,3;0 pg/ml)

²³ IL-6 IEMA Jumbo, 5 x 96 Tests: Beckman-Coulter (Krefeld)

Einzelschritte des IL-6 ELISA:

1.	Zugabe von 100µl Probe bzw. Standard pro Well
2.	Zugabe von 100µl Konjugat pro Well
3.	Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (350 UpM) für 120 min.
4.	3 Waschschritte mit Waschpuffer (350µl pro Well) a 5 min.
5.	Zugabe des Substrats (250µl pro Well)
6.	Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Dunkeln (30 min.)
7.	Zugabe von 50µl Stopplösung pro Well
8.	Messung im ELISA Reader bei 405 nm

Tab. 10

4.2.8. Adhäsionstest mit peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

In Anlehnung an Joanne M. Stevens, 2004(1)

Die Adhäsion von peripheren Blutzellen (PBMC) an Endothelzellen ist abhängig von der inflammatorischen Aktivität der Endothelzellen. Die PBMC wurden aus EDTA-Vollblut von gesunden Spendern mittels Ficoll³⁰ Dichtezentrifugation isoliert, mit Calcein-AM³¹ fluoreszent gefärbt und mit TNF α aktivierten Endothelzellen, unstimulierten Endothelzellen, oder blanken Biomaterialien koinkubiert. Im Anschluss wurde unter mikroskopischer Kontrolle mit PBS gewaschen, bis keine PBMC mehr im Überstand zu sehen waren. Nach Lysieren der adhären PBMC wurde die Fluoreszenz in den Überstand überführt und im Fluorimeter gemessen. Anhand einer Standardgeraden wurde der Intensität der Fluoreszenz eine Zellzahl PBMC zugeordnet mittels derer die adhären PBMC quantifiziert wurden. Auch bei diesen Assay wurde wie beim IL-6 ELISA ein inflammatorischer Aktivierungsfaktor definiert, der die TNF α stimulierte vermehrte Bindung an PBMC beschreibt.

³⁰ *Ficoll-Paque™ PLUS: Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)*

³¹ *Calcein Am 1 mg/mL solution in anhydrous DMSO: Molecular Probes Inc. (Eugene, USA)*

Einzelsschritte des PBMC Adhäsionstests:

1.	Abnahme von 25 ml Vollblut in NaEDTA ³² Blutröhrchen, 15 min. ruhen lassen
2.	Überführen des Vollblutes in ein 50 ml Falcon Röhrchen, in das 15 ml FICOLL Lösung vorgelegt wurde, Zentrifugation bei Raumtemperatur, 1800 UpM, ohne Bremse für 15 min.
3.	Überführen des Buffy Coats in ein frisches 50 ml Falcon Röhrchen und zweimaliges Waschen mit PBS, Zentrifugation bei 4°C, 1100 UpM, mit Bremse für 10 min.
4.	Resuspension des Zellpellets in 2 ml HSVEC Medium und Zugabe von 10 µl Calcein-AM
5.	Inkubation bei 37°C, 5 % CO ₂ für 15 min.
6.	Auswaschen des Calcein-AM mit PBS, Zentrifugation bei 4°C, 1100 UpM, mit Bremse für 10 min.
7.	Zellpellet in 2 ml HSVEC Medium resuspendieren und Zellzahlbestimmung mittels CASY(siehe 3.1.4)
8.	Verdünnen der PBMC Lösung auf eine Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Zellen pro ml
9.	Erstellen einer seriellen Verdünnungsreihe von 2×10^5 bis 7500 PBMC`s pro 150 µl zur Ermittlung einer Standardgerade
10.	Zugabe von 150 µl (entspricht 2×10^5 PBMC`s pro Well) zu den Endothelzellen
11.	Koinkubation bei 37°C, 5 % CO ₂ für 15 min.
12.	mehrmaliges Waschen mit PBS unter Kontrolle des Fluoreszenzmikroskops, bis keine Zellen mehr im Überstand zu sehen sind
13.	Zugabe von 60 µl Triton x-100, Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur, im Dunkeln für 1h
14.	Einfrieren der Proben über Nacht bei -18°C
15.	Auftauen der Proben auf dem Schüttler bei Raumtemperatur im Dunkeln
16.	Überführen der Überstände in eine neue 96-Well Platte
17.	Messung im Fluorimeter ³³ bei 485 nm-535 nm(Fluorescein)

Tab. 11

³² Monovette EDTA KE/ 9ml: Sarstedt (Nümbrecht)

³³Wallac 1420 Victor 3TM plate reader: PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc. (Boston, USA)

4.2.9. 6-keto Prostaglandin F1 α Enzyme Immunoassay

Prostacyclin ist ein Arachidonsäureprodukt, das vor allem von vaskulären Endothelzellen synthetisiert wird. Prostacyclin selbst ist eine instabile Verbindung, die innerhalb einer Halbwertszeit von 2-3 min. nichtenzymatisch zu 6-keto Prostaglandin F1 α (6-keto PGF1 α) abgebaut wird. Dieses Abbauprodukt ist erheblich stabiler als die Ausgangsverbindung ($t_{1/2}$ = 30 min) und wird aus diesem Grund im vorliegenden Assay zur Quantifizierung von Prostacyclin genutzt. Das Funktionsprinzip des Assays besteht darin, dass 6-keto PGF 1 α der Probe und ein Konjugat aus 6-keto PGF 1 α und Acetylcholinesterase um eine limitierte Anzahl spezifischer Bindungsstellen in Kaninchenserum konkurrieren. Der Komplex aus Kaninchenserum und 6-keto PGF1 α , mit oder ohne Acetylcholinesterase, bindet an auf den Boden des Wells aufgebrauchte Anti-Kaninchen Immunglobuline, ungebundene Komplexe werden durch Waschen entfernt. Daraufhin wird Ellman-Reagenz zugegeben, das mit dem Acetylcholinesterase-Konjugat zu einem bei 412 nm absorbierenden Farbstoff (5-thio-2-nitrobenzoesäure) reagiert. Somit ist die Absorption indirekt proportional zur Konzentration von freien 6-keto PGF 1 α in der Probe. Anhand eines 6-keto PGF 1 α Standards wird eine Standardkurve erstellt mittels derer aus der Absorption die Konzentrationen der Proben errechnet werden.

Herstellung der Reagenzien (für alle Verdünnungs- und Lösungsschritte wurde UltraPure Wasser benutzt):

1. EIA Puffer Konzentrat wird in 90 ml Wasser verdünnt
2. 5 ml des Waschpuffer-Konzentrats werden mit 1 ml Tween 20 auf 2l Wasser verdünnt
3. Erstellen einer Standardverdünnungsreihe folgender Konzentrationen:
(500;250;125;62,5;31,3;15,6;7,8;3,9 pg/ml)
4. 6-keto Prostaglandin F1 α -Acetylcholinesterase Konjugat wurde in Portionen zu 100 dtn in 3ml EIA Puffer gelöst, zur optischen Markierung optional EIA Tracer Dye zu 20 % zugegeben.
5. 6-keto Prostaglandin F1 α Antiserum wurde in Portionen zu 100 dtn in 6ml EIA Puffer gelöst und mit EIA Antiserum Dye optisch markiert.

Einzelsschritte des 6-keto Prostaglandin F1 α Enzyme Immunoassay:

1.	50 μ l EIA-Puffer zu jedem Well
2.	50 μ l Standard, beziehungsweise Probe zu den dafür vorgesehenen Wells
3.	50 μ l 6-keto PGF 1 α -Acetylcholinesterase-Konjugat zu allen Wells außer den Blanks
4.	50 μ l 6-keto PGF 1 α -Antiserum zu allen Wells ausser den Blanks
5.	Inkubation für 18h bei 4°C
6.	5 mal waschen mit Waschpuffer
7.	200 μ l Ellman-Reagenz in alle Wells
8.	90–120 min. Inkubation im Dunkeln
9.	Messung der Absorbtion im ELISA-Reader zwischen 405

Tab. 13

4.2.10. Adhäsionstest mit Thrombozyten

In Anlehnung an Silvano Sozzani et al, 2004 (2)

Das Verhindern der Thrombozytenadhäsion und somit der Thrombenbildung im Gefässsystem gehört zu den elementaren Aufgaben der Endothelzellen in vivo, im vorliegenden Assay wurden Thrombozyten von gesunden männlichen Spendern isoliert, mit Calcein AM gefärbt und mit Endothelzellen mit und ohne Thrombin³⁴ Aktivierung, sowie mit blanken Biomaterial coinkubiert. Um eine Aggregation während der einzelnen Schritte zur Isolierung zu verhindern; wurden die Thrombozyten mit aqueous citrate dextrose (80 mg Citronensäuremonohydrat³⁵, 120 mg D+ Glukose Monohydrat³⁶ in 10 ml aqua dest.) an einer durch die Zentrifugation vermittelten Aggregation gehindert. Zur Quantifizierung der Thrombozyten wurden in der Neubauer-Zählkammer 5 Gruppenquadrate zu 16 Kleinstquadraten ausgezählt. Die Multiplikation des Ergebnisses mit dem Faktor 50 liefert die Thrombozytenkonzentration pro μ l. Vor der Koinkubation mit Endothelzellen wurde ACD zum Wiedererhalt der thrombogenen Eigenschaften ausgewaschen. Nach der Koinkubation wurde unter Kontrolle des Fluoreszenzmikroskops gewaschen bis keine freien Thrombozyten mehr im Überstand zu sehen waren. Die Lyse und Messung erfolgte analog dem PBMC Adhäsionstest. Zur Quantifizierung wurde eine Eichkurve genutzt.

³⁴ **Thrombin:** *Sigma-Aldrich* (München)

³⁵ **Citronensäuremonohydrat:** *Merck* (Darmstadt)

³⁶ **D+ Glukose Monohydrat:** *Merck* (Darmstadt)

Einzelsschritte des Thrombozytenadhäsionstests:

1.	Abnahme von 50 ml Vollblut in NaCitrat Blutröhrchen ³⁷ , Verwerfen der ersten 5 ml, den Rest vor der Weiterverarbeitung 15 min. ruhen lassen
2.	Zentrifugation bei 37°C, 1100 UpM, ohne Bremse für 15 min.
3.	Überführen der Fraktion über der sedimentierten Erythrozyten-, Leukozytenfraktion (= platelet rich plasma, PRP) in 5ml Polypropylen Röhrchen ³⁸
4.	Zugabe von ACD zu 10 %, erneute Zentrifugation bei 37°C, 1400 UpM, mit Bremse für 10 min.
5.	Resuspension des Zellpellets in 1ml RPMI ³⁹ + 10 % ACD
6.	Zugabe von 5 µl Calcein AM pro ml, Inkubation bei 37°C, 5 % CO2 für 15 min
7.	Auffüllen der Polypropylen Röhrchen auf 5 ml mit RPMI + 10 % ACD
8.	Zentrifugation bei 37°C, 1400 UpM für 10 min.
9.	Absaugen des Überstandes, resuspendieren des Zellpellets in RPMI ohne ACD
10.	Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer
11.	Erstellen einer seriellen Verdünnungsreihe beginnend mit der unverdünnten Konzentration
12.	15–30 min bei 37°C, 5 % CO2 ruhen lassen
13.	Aktivierung der Endothelzellen mit Thrombin Konzentration 5 U/ml für 15 min. im Brutschrank
14.	Auswaschen des Thrombin mit PBS
15.	Koinkubation von Endothelzellen mit Thrombozyten für 30 min. im Brutschrank
16.	Mehrmaliges Waschen mit PBS unter Kontrolle mit Mikroskop s.o.
17.	Lyse und Messung siehe Adhäsionstest mit PBMC's

Tab. 14

³⁷ **Monovette Citrat 5ml:** Sarstedt (Nümbrecht)

³⁸ **Polypropylene Round Bottom Tube:** Nunc (Roskilde, Dänemark)

³⁹ **RPMI-1640 Medium:** PAN Biotech GMBH (Aidenbach)

4.2.11. 3H-Methyl-Thymidineinbau als Proliferationsmarker

Der Einbau der radioaktiv markierten DNA Base 3H-Methyl-Thymidin in die Zellen wurde zur Untersuchung der Zellproliferation genutzt.

Es wurden Fibroblasten mit einer Zelldichte von 60000 Zellen pro cm² ausgesät und 3 Tage inkubiert. Nach Ablauf der drei Tage wurden Endothelzellen mit einer Zelldichte von 15 000 Zellen pro cm² auf die Fibroblasten ausgesät. Zum selben Zeitpunkt wurden Endothelzellen und Fibroblasten in der beschriebenen Zellzahl alleine auf Rinderperikard ausgebracht. Die Aussaat des 3H-Methyl-Thymidins erfolgte nach 24 Stunden, sowie nach zwei und vier Tagen. Die Ernte fand jeweils 24 Stunden später statt. Dazu wurde ein Zellharvester eingesetzt.

Einzelschritte zur Untersuchung des 3H – Methyl-Thymidin Einbaus

1.	Mit einem Mediumwechsel erfolgt die Zugabe von 7,5 µL 3-H-Methyl-Thymidin ⁴⁰ und Inkubation für 24h
2.	Zellernte:
3.	Zellkulturüberstände radioaktiv entsorgen
4.	2x mit jeweils 200 µL PBS waschen (auch die Waschlösung radioaktiv entsorgen)
5.	50µL/Well Trypsin/PBS/EDTA-Mix pipettieren ⁴¹
6.	Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂ für 10 min
7.	Zugabe von 100µL PBS/Well
8.	Cell-Harvester ⁴² beginnen: Filter einlegen
9.	Platte einlegen und abgelöste Zellsuspension auf Filter saugen
10.	2x mit Aqua (dest.) nachspülen
11.	ca. 30-60 sec mit Vakuum im Cell-Harvester trocknen
12.	Filter aus Cell-Harvester nehmen
13.	Bei 60°C ca. 40-60 min. im Brutschrank trocknen
14.	Filter in Folie geben
15.	ca. 7mL pro Filter Betaplatte-Scintilösung zugeben

⁴⁰ [methyl-³H-]Thymidin, spezifische Aktivität 74 Gbq/mmol bzw. 307MbQ/mg:
Amersham Pharmacia Biotech UK Limited (Buckinghamshire, UK): Best. Nr.: TRA310 Batch Nr.: 290
Konzentration im Well 0,5 µCi/mL 0,075µCi/Well

⁴¹ TrypsinMix: 1 Teil 0,5M EDTA (pH = 8) + 1 Teil Trypsin⁴¹ (10x) + 2 Teile PBS (1x)

⁴² Cell-Harvester: Harvester for MicroBeta IH-110-96WS Harvester 96: Inotech AG or Inotech Encapsulation AG (Dottikon, Schweiz)

16.	Folie verschweißen
17.	Messung im β -Counter ⁴³
18.	Entsorgung der radioaktiven Abfälle

Tab. 15

4.3. Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit Sigma Stat 3.0⁴⁴, die graphischen Darstellungen mit Sigma Plot 8.0⁴² durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Ein Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem student-t test, beziehungsweise dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Zur Überprüfung einer Korrelation zwischen zwei Variablen wurde das Verfahren nach Pearson eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ angesetzt.

⁴³ β -Counter: Wallac MicroBeta® TriLux 1450 Microbeta Liquid Scintillation & Luminescence Counter PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc. (Boston, USA)

⁴⁴ Systat Software Inc.

5. Ergebnisse

5.1. Etablierung des Adhäsionstests an Endothelzellen mit PBMC

5.1.1. Standardkurve zur Bestimmung der Anzahl an PBMC

Zur Quantifizierung der PBMC wurde bekannten Zellzahlen an PBMC die Intensität eines Fluoreszenzsignals (Fluorescein) zugeordnet. Dazu wurde eine serielle Verdünnung von 2×10^5 bis 0 PBMC hergestellt. Nach Adhärenz der PBMC an Polystyrol wurde die Intensität der Fluoreszenz im Fluorimeter gemessen. Die Zellzahl korrelierte mit der Fluoreszenz direkt proportional, bei einem Korrelationskoeffizienten $r^2=0,99$ (Abb. 1).

5.1.2. Adhäsionstest

Der Versuch wurde mit vier HSVEC Kulturen in vierfach-Bestimmung durchgeführt. Im Mittel adhärten 7026 ± 1452 PBMC auf einer EC-Monolayerfläche von $0,3\text{cm}^2$. Nach Stimulation der EC mit TNF (10ng/ml , 6h) erhöhte sich die Anzahl um den Faktor $3,0 \pm 0,6$ signifikant (Abb. 2). Die Endothelialisierung von Polystyrol führte zu einer signifikanten Reduktion der PBMC Bindung (Abb.2).

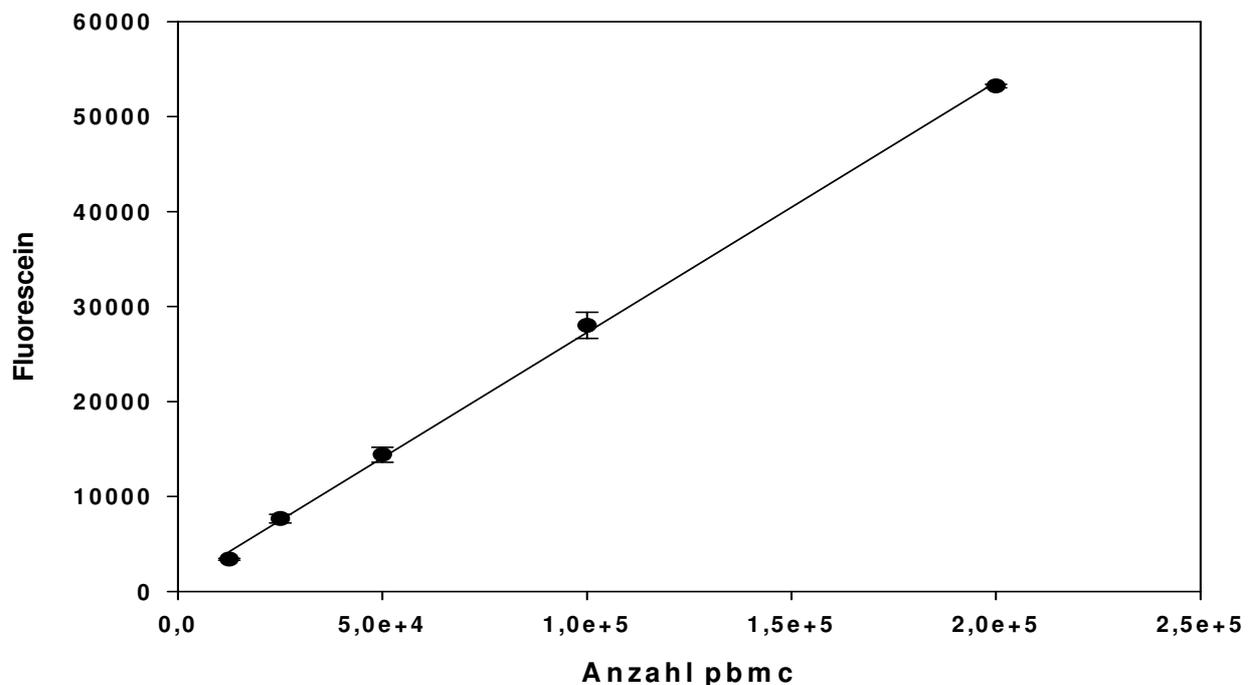


Abb. 1 gibt die lineare Abhängigkeit der lysierten, Calcein-Am gefärbten PBMC zur Zellzahl wieder. Der hierfür ermittelte Korrelationskoeffizient lag bei 0,99

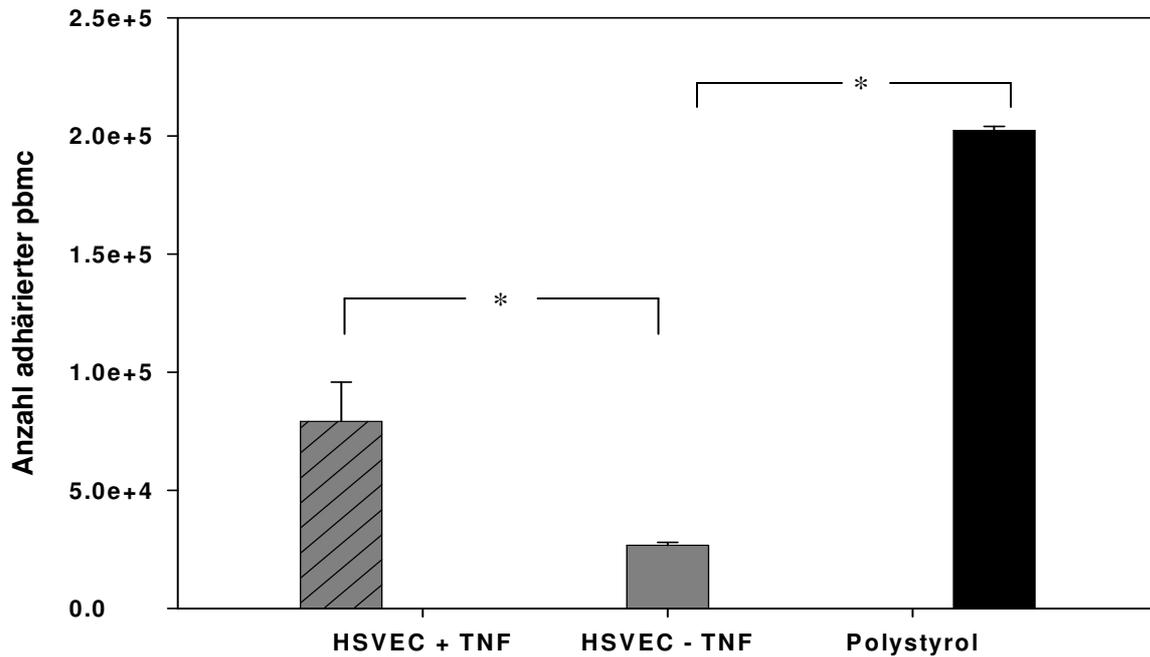


Abb. 2: PBMC Adhäsion an HSVEC und Polystyrol (HSVEC = human saphenous vein endothelial cells, TNF = Tumor Nekrose Faktor α), * $p < 0,05$

5.2. Etablierung des Adhäsionstests an Endothelzellen mit Thrombozyten

Der Versuch zur Etablierung des Thrombozyten-Adhäsionstest wurde mit fünf Kulturen in dreifach-Bestimmung durchgeführt. Bei der Erstellung der Standardkurve zur Ermittlung der Thrombozytenzahl aus der gemessenen Fluoreszenz ergab sich eine lineare Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,98$. (Abb.3).

An mit Thrombin (5U/ml, 15 min, 37 C°) aktivierte Endothelzellen adhärten signifikant mehr Thrombozyten als an nicht stimulierte Endothelzellen. Der hierfür ermittelte Faktor betrug $4,8 \pm 1,8$. Weiterhin ergab sich eine signifikante Reduktion der Thrombozyten-Adhäsion an Polystyrol durch dessen Endothelialisierung (Faktor $5,3 \pm 2,4$). Siehe Abb.4.

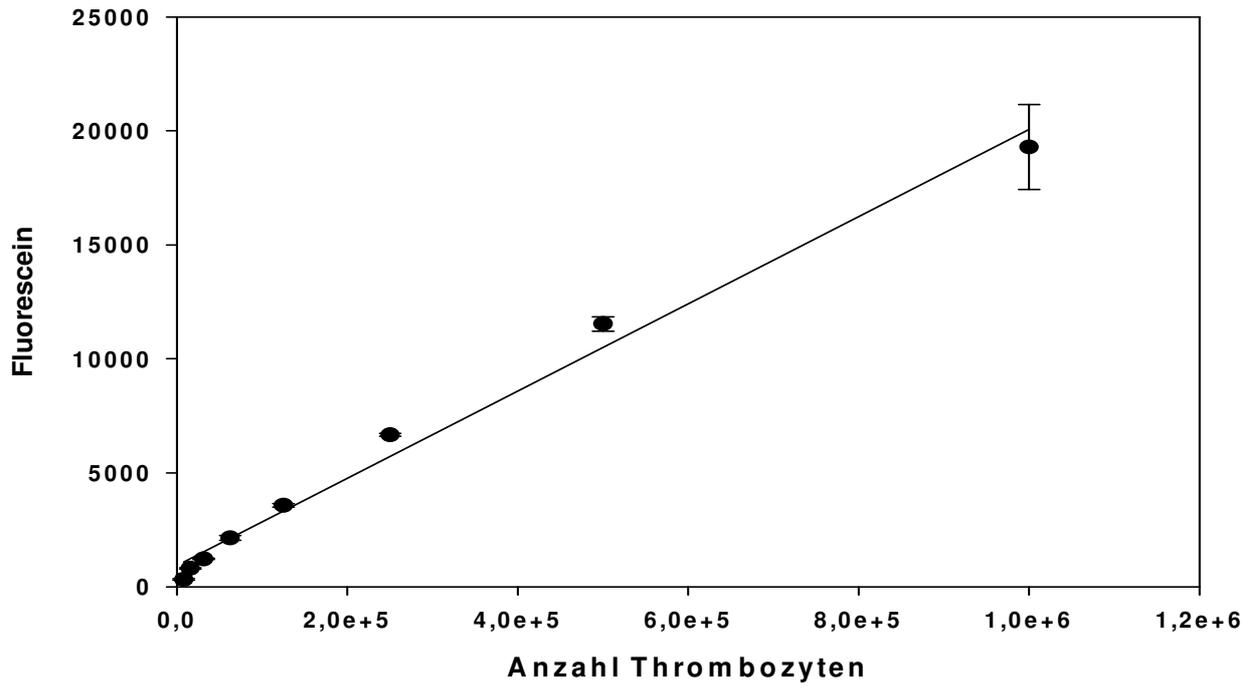


Abb. 3: Standardkurve zur Ermittlung der Thrombozytenzahl aus der gemessenen Fluoreszenz.
Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,98$

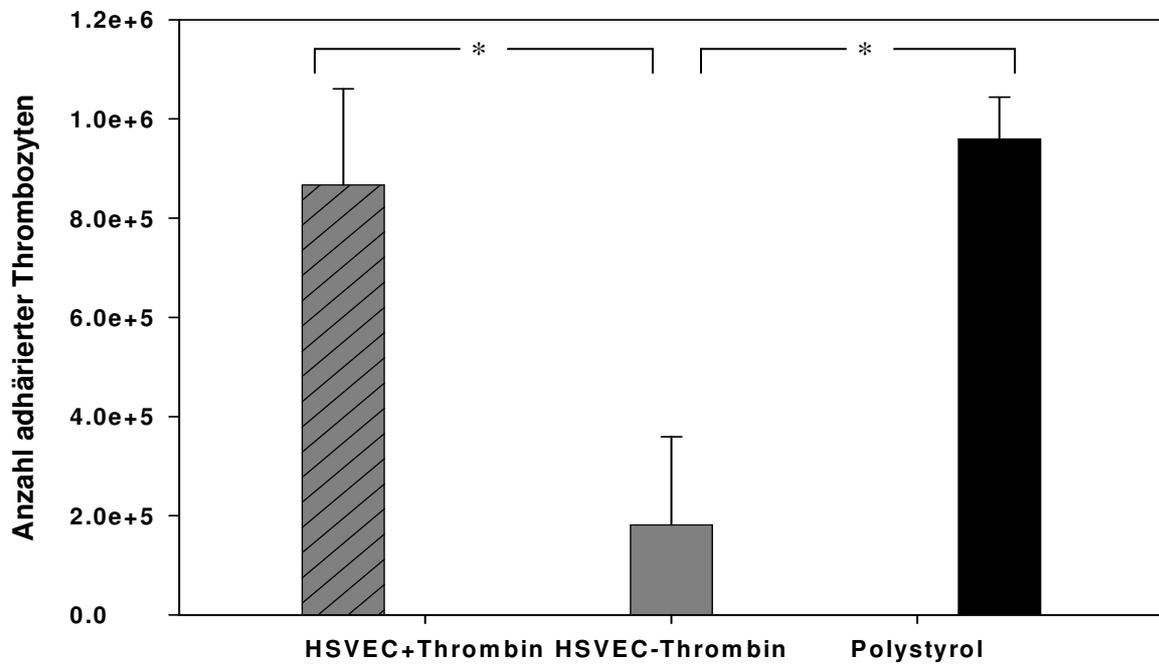


Abb. 4: Bindung von Thrombozyten an HSVEC und Polystyrol
* $p < 0,05$

5.3. Abschätzung des Endothelialisierungspotentials verschiedener Biomaterialien mittels Rasterelektronenmikroskopie

Zur morphologischen Untersuchung verschiedener biologischer Herzklappenmaterialien (siehe 3.2.1) wurde die Rasterelektronenmikroskopie genutzt. Die Darstellung blanken, Glutaraldehyd fixierten, detoxifizierten Rinderperikards (NR) stellt die Ausgangssituation zur Ermittlung des Endothelialisierungspotentials der verschiedenen Biomaterialien dar. In viertausendfacher Vergrößerung kommt hier ein Gewirk kollagener Strukturen zur Darstellung, das Material erweist sich als vollständig dezellularisiert (Abb.5).

Bei hyperkonfluenter Aussaat und vierundzwanzigstündiger Inkubation konnten auf Glutaraldehyd fixierten Rinderperikard keine vitalen Zellen, auf einer Glutaraldehyd fixierten porkine Mitralklappe konnten vitale Zellen, jedoch kein konfluenter Monolayer nachgewiesen werden (Abb.6 und 7). Unter den selben Bedingungen zeigten sich auf einer in Vodka aufbewahrten porkinen Aortenklappe, sowie auf detoxifizierten Rinderperikard (NR) ausgebreitete Endothelzellen, die einen Monolayer ausbildeten (Abb.8 und 9). Nach hypokonfluenter Aussaat auf NR konnte nach 5tägiger Inkubation keine Proliferation der Zellen nachgewiesen werden (Abb.10). Der Vergleich des blanken Materials (Abb.5) mit dem erfolgreich endothelialisierten Material (Abb.8 und 9) und einer humanen Mitralklappe (Abb.11) zeigte eine Annäherung an die physiologische Morphologie mittels Endothelialisierung.

	Vitale Zellen nach 24 Stunden	Monolayer nach 24 Stunden	Proliferation innerhalb von 5 Tagen
Polystyrol	+	+	+
Porkine Mitralklappe Glutaraldehyd fixiert	+	-	-
Porkine Aortenklappe in Vodka aufbewahrt	+	+	-
Rinderperikard Glutaraldehyd Fixiert	-	-	-
Rinderperikard NoReact detoxifiziert	+	+	-

Tab. 14: Ergebnisse der Rasterelektronischen Untersuchung zur Endothelialisierung verschiedener Biomaterialien

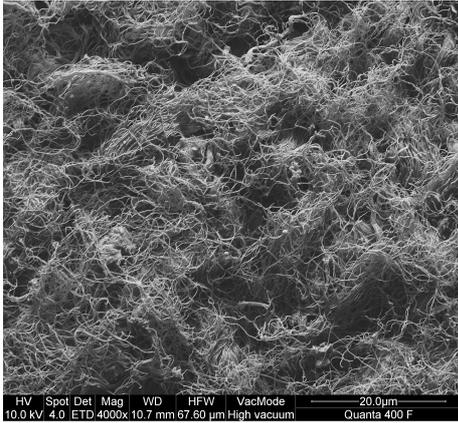


Abb. 5: Zeigt die Struktur von Glutaraldehyd fixierten und detoxifizierten Rinderperikard(NR) in 4000 facher Vergrößerung, bei den „spagettiförmigen“ Strukturen handelt es sich um Kollagenfibrillen.

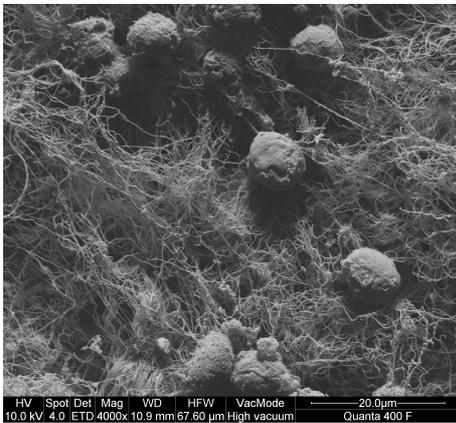


Abb. 6: Vereinzelte, nicht vitale Zellen auf Glutaraldehyd fixierten Rinderperikard nach hyperkonfluenter Aussaat und 24 Stunden Inkubationsdauer

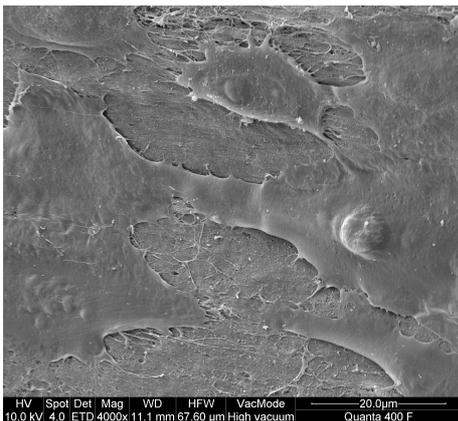


Abb. 7: Ausgebreitete Zellen ohne Ausbildung eines Monolayers auf einer Glutaraldehyd fixierten porkinen Mitralklappe nach hyperkonfluenter Aussaat.

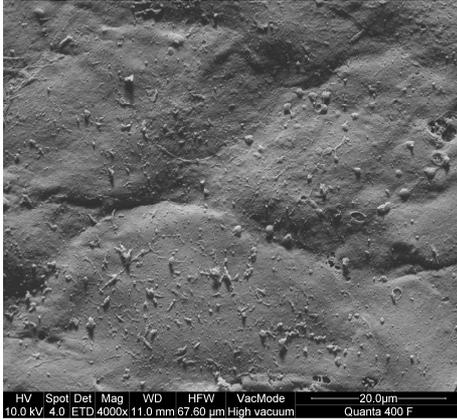


Abb. 8: Konfluenten Monolayer nach hyperkonfluenter Aussaat auf einer in Vodtka aufbewahrten porkinen Aortenklappe.

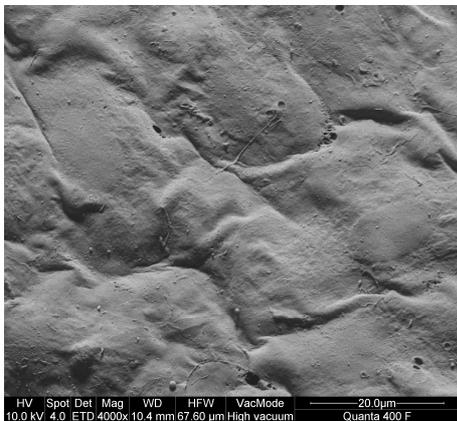


Abb. 9: Monolayer auf NR detoxifizierten Rinderperikard nach hyperkonfluenter Aussaat.

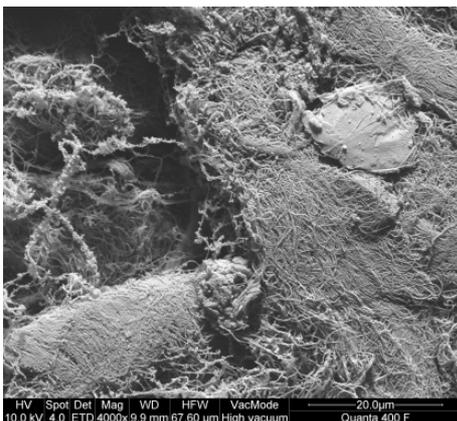


Abb. 10: Kein Wachstum nach hypokonfluenter Aussaat und 5-tägiger Inkubation auf NR detoxifizierten Rinderperikard

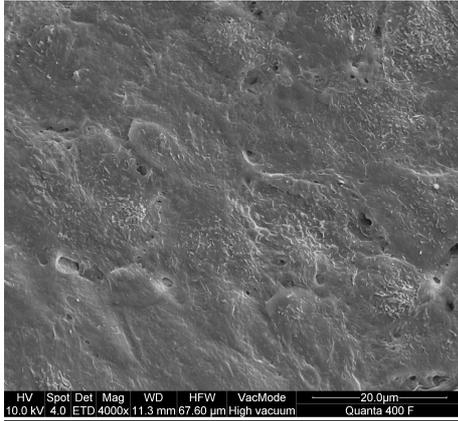


Abb. 11: Native, humane Mitralklappe im atrioventrikulären Blick zeigt vitale Endothelzellen mit Mikrovilli.

5.4. Vergleich zellulärer Funktionsparameter von Endothelzellen unter Kulturbedingungen mit auf Rinderperikard (NR) adhären Endothelzellen

Aufgrund der guten Adhäsionseigenschaften von HSVEC auf NR, wurden die zellulären Eigenschaften von HSVEC auf diesen Material untersucht. In Vodka aufbewahrte porkine Aortenklappen wurden aufgrund mangelnder Verfügbarkeit nicht weiter untersucht.

Die Versuchsbedingungen entsprachen sich für alle folgenden Experimente. Es wurden HSVEC (5 Kulturen) in hyperkonfluenter Zelldichte auf das Material ausgebracht, und für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und daraufhin die einzelnen Experimente zur Ermittlung des Funktionsstatus der Zellen. Bei Polystyrol handelt es sich um das unter Standard-Zellkultur-Bedingungen verwendete Material (tissue-cultured-polystyrene).

5.4.1. Zelldichte

Bezüglich der Zelldichte von HSVEC in Abhängigkeit des zugrundeliegenden Materials ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen HSVEC auf NR und Polystyrol. Die Tabelle 15 stellt diese Ergebnisse anhand der absoluten Zellzahlen pro cm² dar.

	Anzahl HSVEC pro cm ²	Standardabweichung	Statistische Signifikanz
HSVEC auf Rinderperikard (NR)	142500	9529	Unterschied nicht statistisch signifikant
HSVEC auf Polystyrol	141875	16026	

Tab. 15 Kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zelldichte auf Rinderperikard und unter Kulturbedingungen

5.4.2. Biochemische Aktivität

Die Ermittlung der biochemischen Aktivität anhand des MTT Assays ergab eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität von auf Rinderperikard adhärenen HSVEC verglichen mit HSVEC auf Polystyrol um den Faktor $2,5 \pm 0,4$ (Abb. 12)

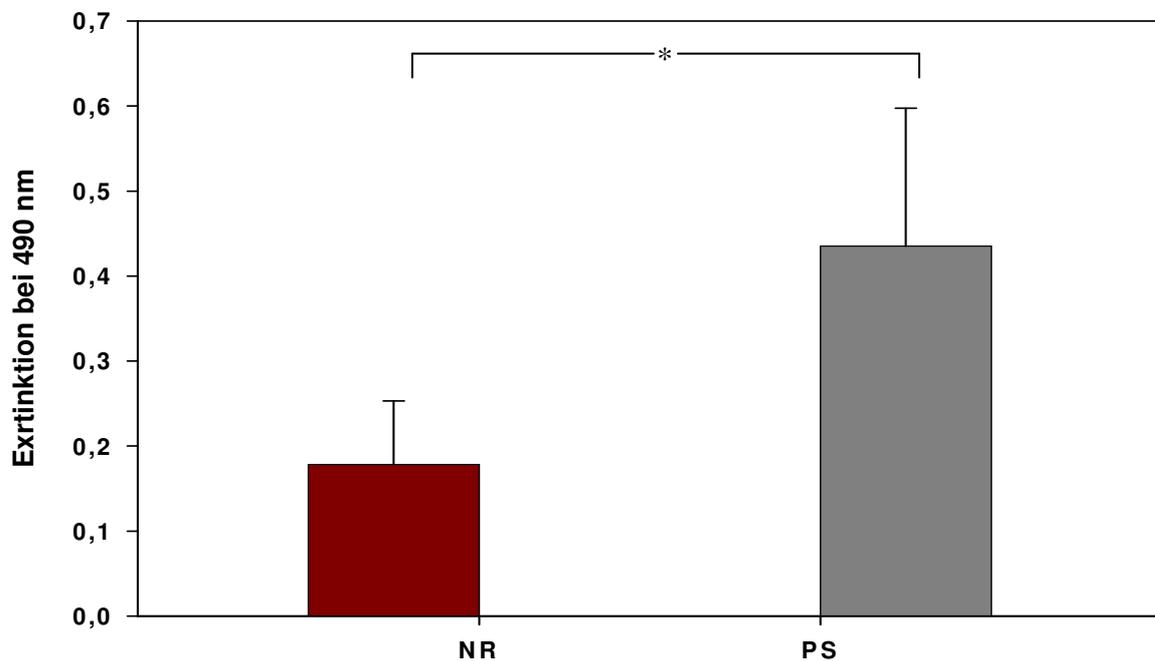


Abb.12 : Graphische Darstellung der mitochondrialen Aktivität von HSVEC auf Rinderperikard(NR) und Polystyrol(PS). * $p < 0,05$

5.4.3. Interleukin-6 Sekretion

Der IL-6 Standard zeigte eine lineare Abhängigkeit der eingesetzten IL-6 Konzentration von der gemessenen Extinktion, der zugehörige Korrelationskoeffizient r^2 betrug 0,99.(Abb.13).

Die TNF induzierte Freisetzung von Interleukin 6 aus HSVEC war unabhängig vom zugrundeliegenden Materials (Abb.14).

Allerdings war die durch TNF induzierte Steigerung der IL-6 Konzentration bei HSVEC auf Rinderperikard im Vergleich zu HSVEC auf Polystyrol signifikant reduziert (Faktor $3,4 \pm 0,8$ vs Faktor $10,1 \pm 4,1$; $p < 0,05$). Dies ergibt sich daraus, dass im unstimulierten Zustand von HSVEC auf Rinderperikard signifikant mehr IL-6 in den Überstand sekretiert wird, als dies bei HSVEC unter Kulturbedingungen der Fall ist(Abb.14).

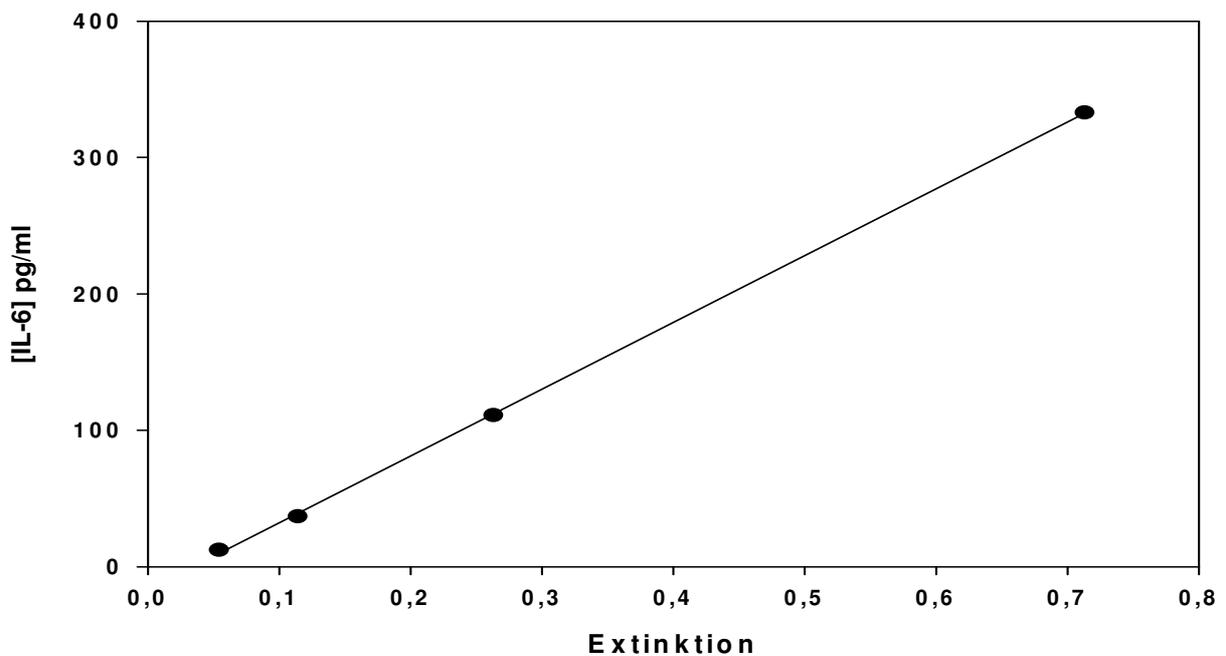


Abb.13: Standardkurve zur Ermittlung der Interleukin 6 Konzentration
Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,99$

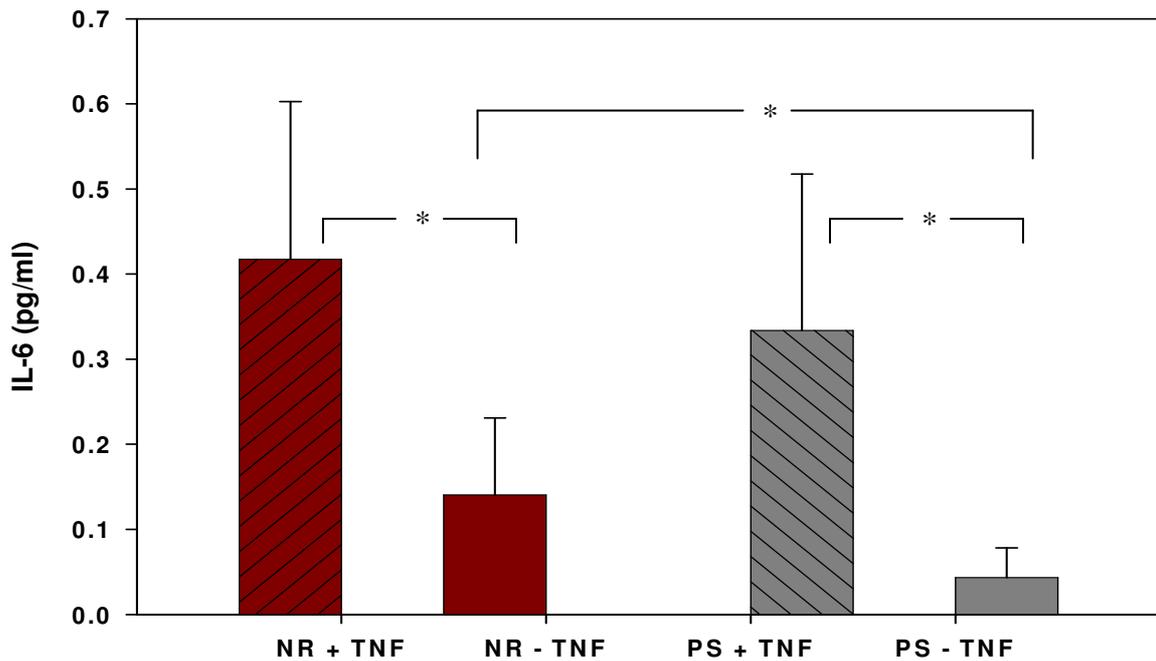


Abb.14: Basale und TNF stimulierte IL-6 Sekretion von HSVEC kultiviert auf NR und PS
*: $p < 0,05$

5.4.4. PBMC-Adhäsion

Auf NR adhärenente HSVEC zeigen nach Stimulation mit TNF α eine vermehrte PBMC Bindung. Die maximale Anzahl der unter TNF α Stimulation bindenden PBMC unterscheidet sich nicht signifikant von HSVEC unter Kulturbedingungen. Allerdings ist zu beobachten, dass der durch TNF α induzierte Faktor der vermehrten Bindung für auf Rinderperikard adhärenente HSVEC vermindert ist ($1,4 \pm 0,3$ auf NR vs $2,1 \pm 0,6$ auf PS). Die unstimulierte PBMC-Bindung unterscheidet sich signifikant zwischen Endothelzellen auf Rinderperikard und Polystyrol . um den Faktor $1,4 \pm 0,3$ (Abb.15). Weiterhin zeigt der Versuch, dass die Endothelialisierung von Rinderperikard unter diesen Versuchsbedingungen nicht zur Reduktion der Bindung von PBMC führt (Abb.16).

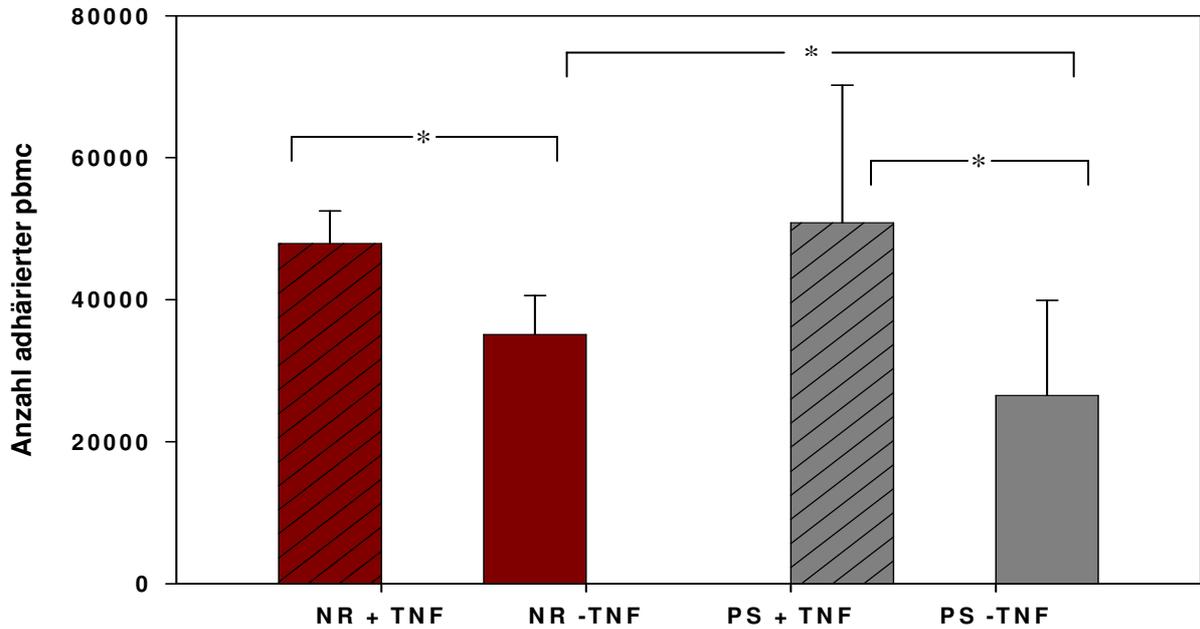


Abb. 15 Basale und TNF stimulierte Adhäsion von PBMC an HSVEC kultiviert auf NR und PS

(NR = Rinderperikard, PS = Polystyrol, TNF = Tumor Nekrose Faktor α)

* $p < 0,05$

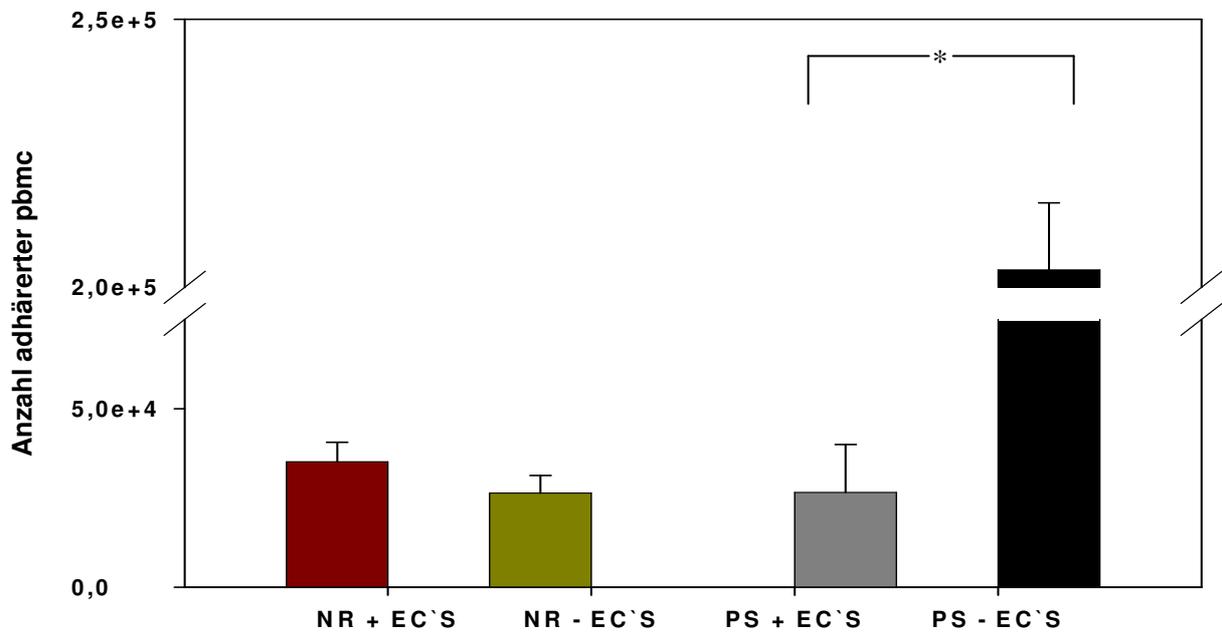


Abb. 16: Adhäsion von PBMC an endothelialisiertes und blankes Biomaterial

(NR + EC,-EC = endothelialisiertes, blankes Rinderperikard,

PS + EC,-EC = endothelialisiertes, blankes Polystyrol)

* $p < 0,05$

5.4.5. Prostacyclin Sekretion

Der Vergleich der Prostacyclin Konzentration im Überstand von HSVEC auf PS mit HSVEC auf NR ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Endothelzellen auf beiden Materialien sekretierten Prostacyclin in vergleichbaren Mengen. Die Tabelle 16 stellt die gemessenen Prostacyclin Konzentrationen, die Abbildung 17 die Standardkurve zu deren Ermittlung dar.

	Prostacyclin pg/ml	Standardabweichung	Statistische Signifikanz
HSVEC auf NR	2636	863	Nicht signifikant
HSVEC auf PS	2714	283	

Tab. 16 Vergleichbare Prostacyclin Sekretion von HSVEC auf beiden Materialien

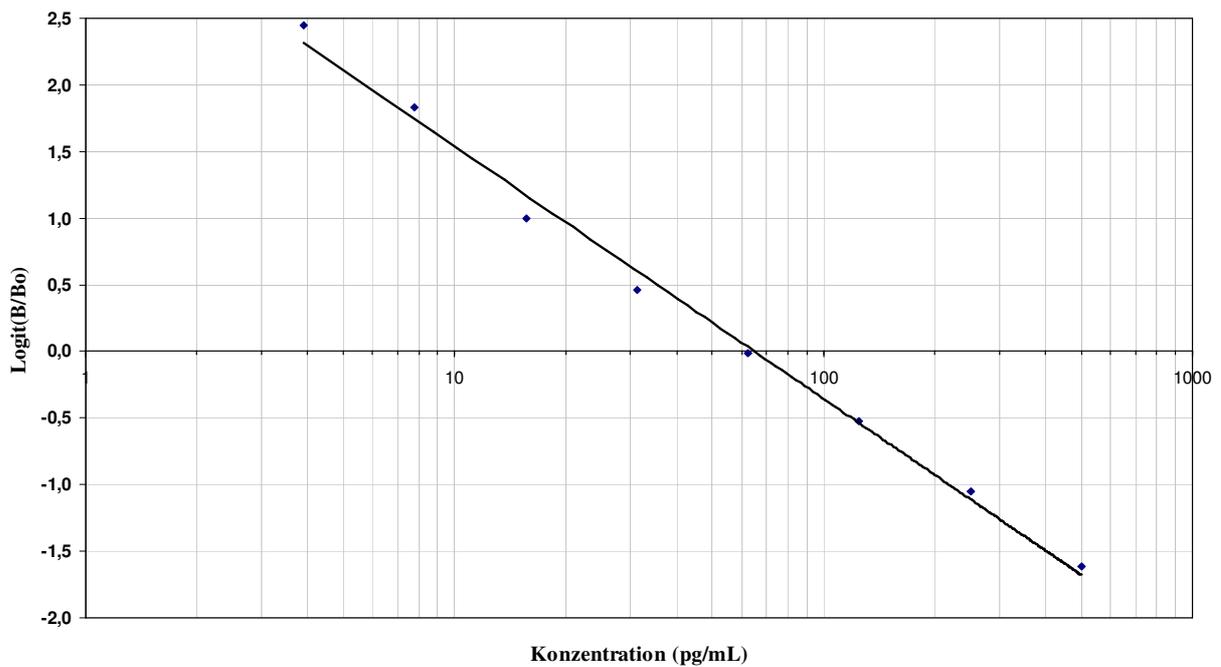


Abb.17: Standardkurve zur Ermittlung der Prostacyclin-Konzentration

5.4.6. Thrombozytenadhäsion

Endothelialisierung führte zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenbindung sowohl an Polystyrol, als auch an NR. Dieser Effekt war auf Polystyrol ausgeprägter (Faktor $4,0 \pm 1,0$ vs $2,2 \pm 0,5$), da an blankes NR verglichen zu blanken Polystyrol signifikant weniger HSVEC binden. Die Bindung von Thrombozyten an HSVEC zeigte keine Abhängigkeit vom zugrundeliegenden Material, es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Thrombozyten-Bindung an Endothelzellen auf Polystyrol und NR.(Abb.18).

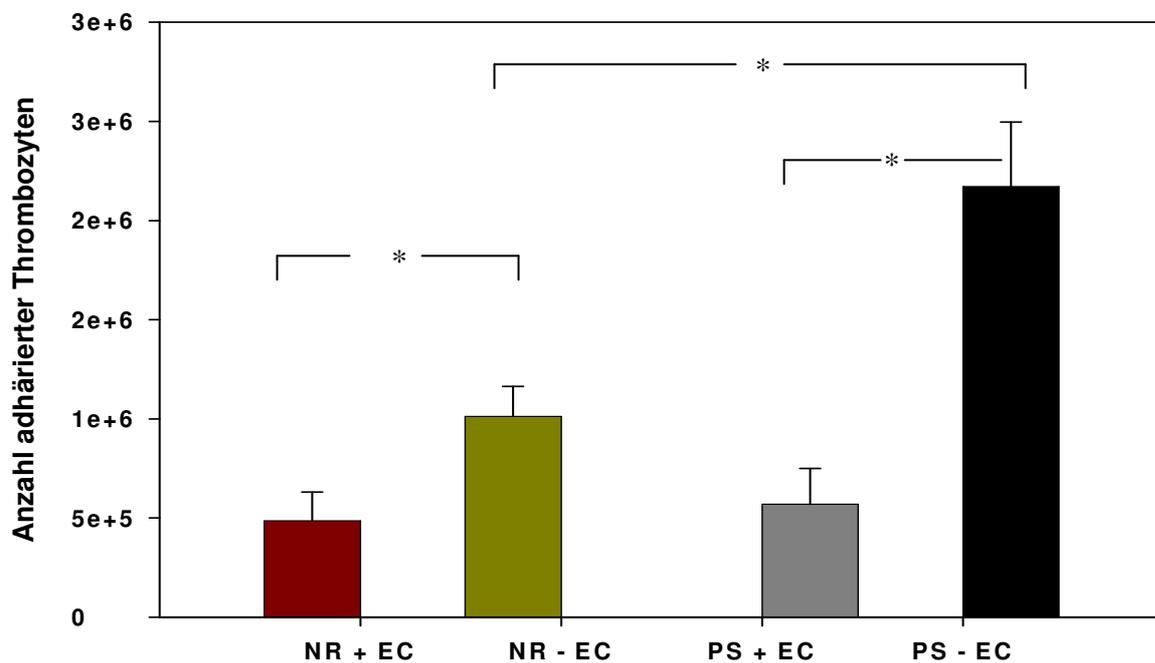


Abb. 18: Adhäsion von Thrombozyten an endothelialisiertes und blankes Biomaterial

(NR + EC,-EC = endothelialisiertes, blankes Rinderperikard,
PS + EC,-EC = endothelialisiertes, blankes Polystyrol)

* $p < 0,001$

5.5. Verbesserung der Proliferationseigenschaften von HSVEC auf Rinderperikard (NR) mittels Fibroblasten preseeding

Wie im 1. Teil gezeigt, adhären HSVEC auf NR und bilden einen Monolayer, Proliferation der Zellen war allerdings nicht nachweisbar. Im 2. Versuchsteil wurde das Proliferationspotential von Fibroblasten und Endothelzellen alleine, sowie die Proliferation von Endothelzellen nach Fibroblasten preseeding auf NR untersucht. Als Kontrolle für diesen Versuch dienten Endothelzellen unter Kulturbedingungen. Letztere erwiesen sich zu allen drei Mess-Zeitpunkten als proliferativ aktiv (Thymidineinbaurate: 8228 ± 1848 ccpm nach 2d, 9435 ± 2550 ccpm nach 3d und 6717 ± 1618 ccpm nach 5d). Auf NR als Kultivierungsfläche konnte weder für Endothelzellen noch für Fibroblasten Einbau von ^3H -Thymidin beobachtet werden (Abb. 19). Nach preseeding von Fibroblasten zeigte sich jedoch ein Thymidineinbau der den der beiden Zelltypen alleine um das bis zu zehnfache überstieg (Abb.19). Weiterhin zeigte sich eine Abnahme der Einbaurate von den vierten auf den fünften Tag, was für Endothelzellen durch die Proliferationshemmung bei Ausbildung eines Monolayers typisch ist.

Die gesteigerte Proliferationsaktivität der HSVEC in Kokultur gegenüber adhären HSVEC beziehungsweise Fibroblasten erwies sich zu allen drei Zeitpunkten als statistisch signifikant ($p < 0,05$).

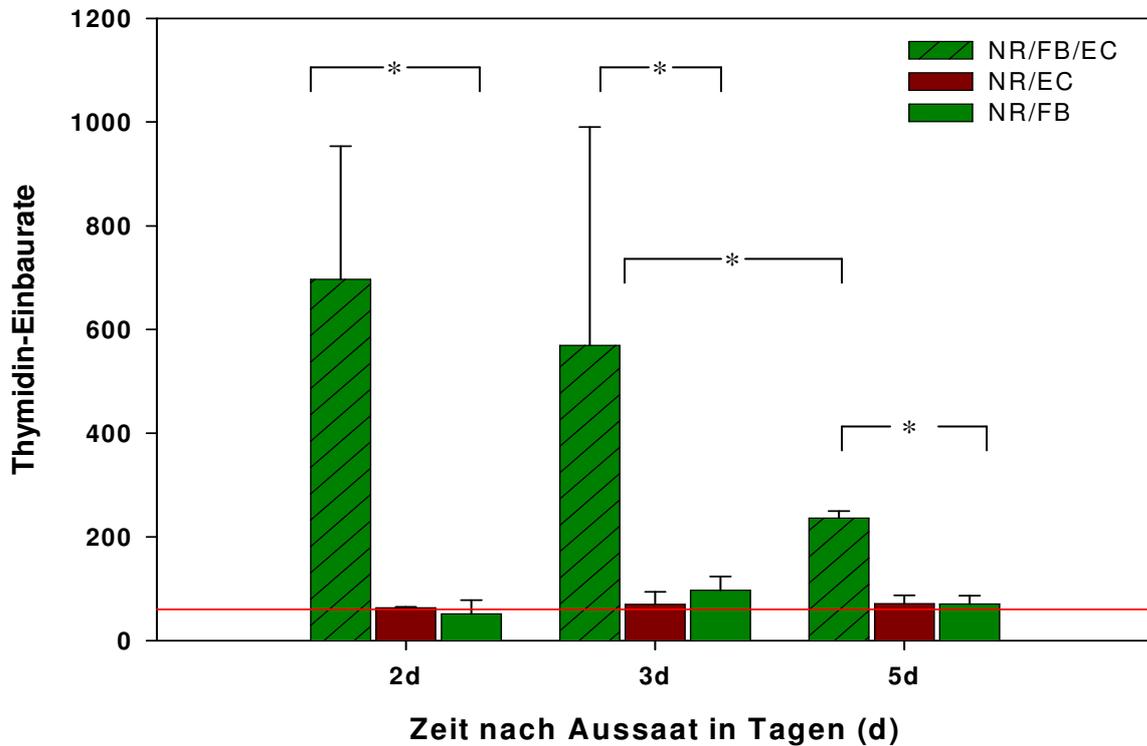


Abb. 19: Thymidineinbau verschiedener Zellen auf Rinderperikard.
(NR = Rinderperikard, FB = Fibroblasten, EC = Endothelzellen)
Die rote horizontale Linie stellt den Messhintergrund dar.
Der Versuch wurde mit 3 Kulturen in 4fach-Bestimmung durchgeführt
* $p > 0,05$

5.6. Histologische und Immunhistochemische Darstellung von Fibroblasten und Endothelzellen auf Rinderperikard (NR)

Zur Darstellung kamen sowohl Fibroblasten und Endothelzellen getrennt auf NR adhären, als auch nach Kokultur. Die Abbildungen 20 bis 22 zeigen in zwanzigfacher Vergrößerung eine Hämatoxylin–Eosin (HE) Färbung des blanken Biomaterials (NR), eine HE Färbung von mit Fibroblasten und Endothelzellen in Kokultur besiedelten NR, sowie eine immunhistochemische Färbung von mit von Willebrand Faktor markierten Endothelzellen nach Kokultur mit Fibroblasten. Die HE Färbung der Kokulturen zeigt im Querschnitt eine vollständige Bedeckung der Oberfläche mit Zellen (Abb. 21), eine Unterscheidung zwischen Fibroblasten und Endothelzellen ist jedoch nicht möglich. Die von Willebrand Färbung (Abb. 22) zeigt perlschnurartig aufgereite Endothelzellen an der Oberfläche des Präparats, die Anordnung der Endothelzellen lässt auf Bildung eines konfluenten Monolayers nach hypokonfluenten Aussaat schließen.

Die Abbildungen 23 bis 25 zeigen vierzigfache Vergrößerungen unter den oben bereits beschriebenen Bedingungen, hier verdeutlicht sich die vollständige Bedeckung der Oberfläche mit Zellen (Abb. 24), sowie die perlschnurartige Anordnung der Endothelzellen (Abb. 25).

In der Abbildung 26 sind mit Vimentin Antikörpern markierte Fibroblasten in vierzigfacher Vergrößerung dargestellt. Positiv gefärbte Zellen sind nicht nur an der Oberfläche des Präparats zu sehen, sondern scheinen auch in die Tiefe des Schnitts zu infiltrieren.

Auf eine Doppelfärbung von Endothelzellen und Fibroblasten nach Kokultur musste aus technischen Gründen verzichtet werden.

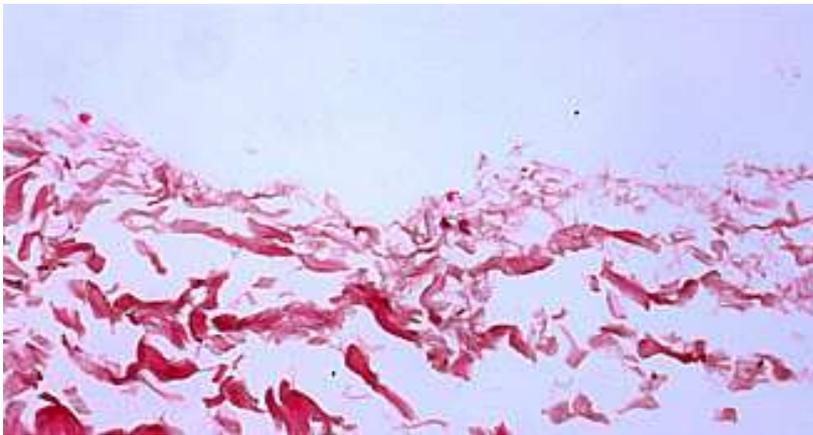


Abb. 20: HE Färbung von blanken Rinderperikard (NR) in 20facher Vergrößerung

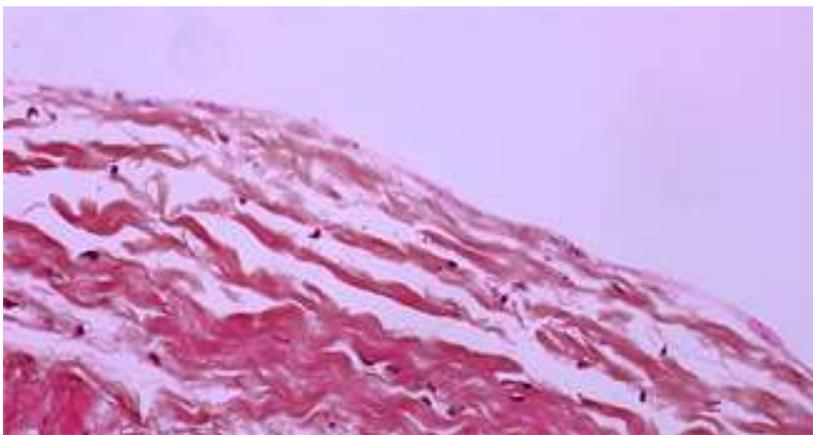


Abb. 21: Bedeckung der Oberfläche mit Zellen nach Fibroblasten – Endothelzell Kokultur, HE Färbung, zwanzigfach vergrößert

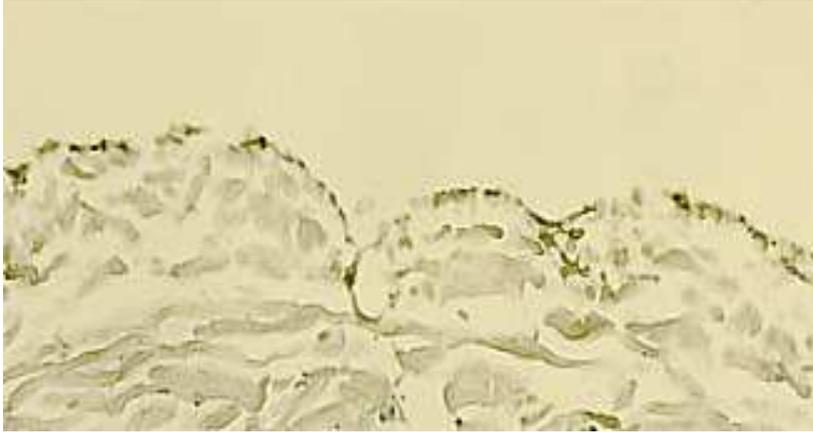


Abb. 22: Perlschnurartig aufgereihete Endothelzellen in immunhistochemischer von Willebrand Faktor Färbung

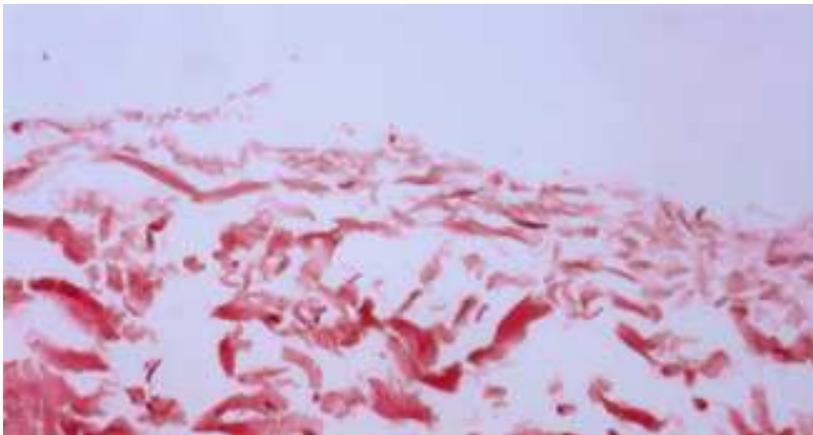


Abb. 23: HE Färbung eines NR Blank in 40facher Vergrößerung

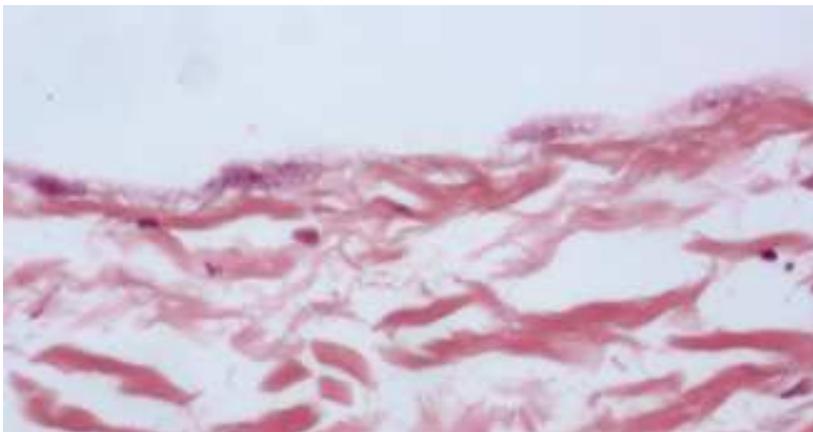


Abb. 24: HE Färbung nach EC/FB Kokultur in 40facher Vergrößerung

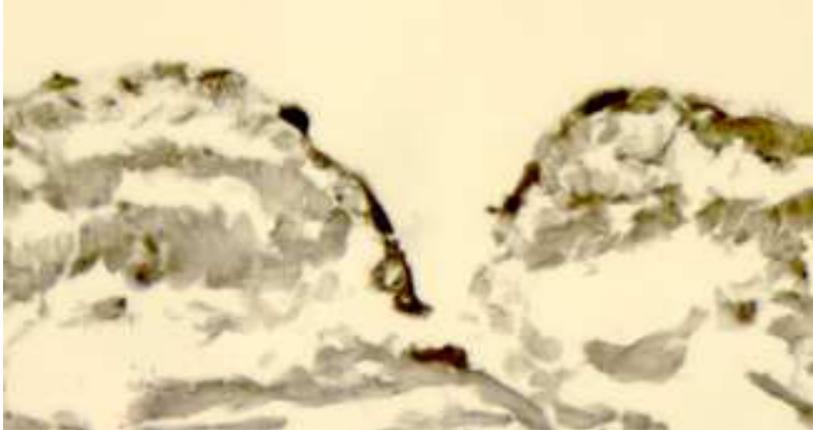


Abb. 25: von Willebrand Faktor gefärbte Endothelzellen nach Kokultur mit Fibroblasten

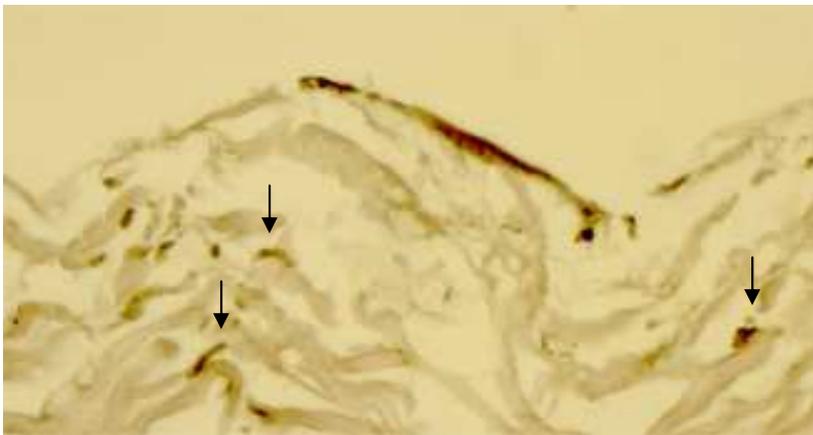


Abb. 26: Vimentin markierte Fibroblasten, positive Zellen an der Oberfläche und in der Tiefe des Schnitts (schwarze Pfeile)

5.7. Vergleich zellulärer Funktionsparameter von direkt auf NR adhärennten Endothelzellen mit Endothelzellen auf NR nach preseeding mit Fibroblasten

Ziel der folgenden Versuche war es zu ermitteln, ob preseeding von Fibroblasten die funktionellen Parameter PBMC Adhäsion, Thrombozyten Adhäsion und Prostacyclin Sekretion von auf Rinderperikard (NR) adhärennten HSVEC beeinflusst, beziehungsweise, wie sich diese Parameter im Vergleich zu direkt auf Biomaterial adhärennten Endothelzellen (siehe 1. Versuchsteil) verhalten. Die Bedingungen der folgenden drei Versuche entsprachen sich: Fibroblasten wurden hyperkonfluent auf NR ausgebracht. Nach dreitägiger Inkubation wurden auf die Fibroblasten Endothelzellen hypokonfluent ausgebracht und weitere fünf Tage zur Proliferation inkubiert. Mediumwechsel fanden zur Aussaat der Endothelzellen, sowie drei Tage nach dieser statt.

Die Vergleichsgruppe (Endothelzellen direkt auf Rinderperikard) wurde 24 Stunden vor Ablauf der fünftägigen Inkubation hyperkonfluent ausgesät. Abbildung 27 stellt den Versuchsaufbau des zweiten Teils der Arbeit dar.

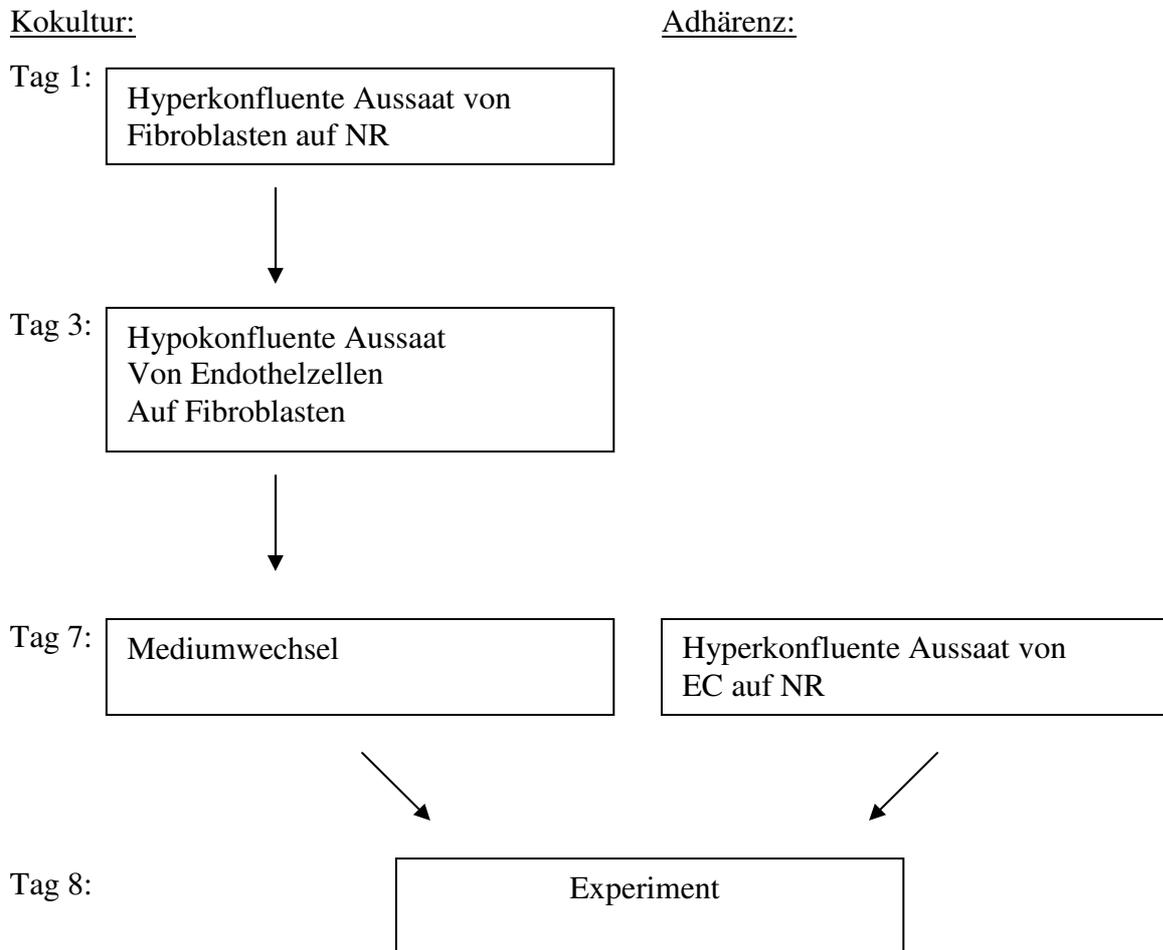


Abb. 27: Schema der Aussaat im 2. Versuchsteil

5.7.1. PBMC-Adhäsion

Bezüglich der Adhäsion inflammatorischer Zellen (PBMC) hatte sich gezeigt, dass der durch TNF induzierte inflammatorische Aktivierungs-Faktor (siehe 3.2.6) der vermehrten PBMC Adhäsion bei direkt auf NR adhärennten Endothelzellen im Vergleich zu Kulturbedingungen vermindert ist (siehe 4.4.4).

Dieser Versuch ergab, dass auf Fibroblasten gewachsene im Vergleich zu direkt auf Rinderperikard adhärennten Endothelzellen eine verstärkte maximale PBMC Adhäsion bei unveränderten unstimulierten Status aufweisen. Daraus resultiert ein Anstieg des TNF induzierten Aktivierungs-Faktors von $1,3 \pm 0,4$ auf $1,6 \pm 0,1$ (Tab.17).

	Anzahl adhärerter PBMC	Aktivierungs-Faktor	Statistische Signifikanz
NR/FB/EC + TNF	37699 ± 2948	1,6 ± 0,1	p < 0,05
NR/EC + TNF	30786 ± 3875	1,3 ± 0,4	
NR/FB/EC-TNF	24410 ± 3201		Nicht signifikant
NR/EC -TNF	23289 ± 5130		

Tab. 17 Induktion der Adhäsion inflammatorischer Zellen durch TNF
(NR = Rinderperikard, FB = Fibroblasten, EC = Endothelzellen,
TNF = Tumor Nekrose Faktor)

Der Versuch zeigte weiterhin wie auch schon in 3.2.6, dass die Endothelialisierung von NR keine Reduktion der PBMC Adhäsion bewirkt, wenn dass zum Vergleich untersuchte blanke NR Material 24h in Zellkulturmedium (Zusammensetzung siehe 2.) inkubiert wurde. Der Vergleich von blanken NR nach 24stündiger Inkubation mit blanken NR, dass 8 Tage in Zellkulturmedium inkubiert wurde, ergab eine Vermehrung der PBMC Adhäsion um $58\% \pm 6\%$ nach 8-tägiger Inkubation. Diese Steigerung erwies sich als statistisch signifikant (p < 0,001).

Der Vergleich der PBMC Adhäsion an nach Fibroblasten preseeded endothelialisiertes NR mit blanken ebensolange inkubierten (8 Tage) NR ergab hiedurch eine Reduktion der PBMC Adhäsion durch Endothelialisierung um den Faktor $1,6 \pm 0,1$ (Abb. 28).

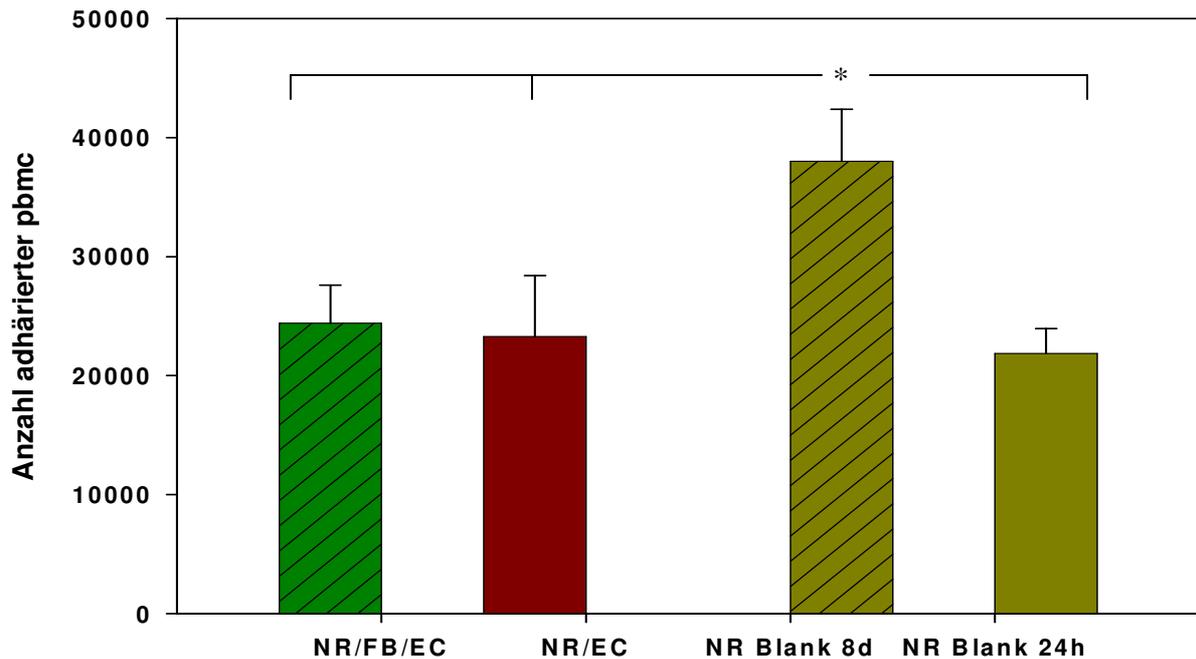


Abb. 28: Adhäsion von PBMC an endothelialisiertes und blankes Rinderperikard (NR = Rinderperikard, FB = Fibroblasten, EC = Endothelzellen, 8d = 8-tägige Inkubation in Kulturmedium, 24h = 24-stündige Inkubation in Kulturmedium), * $p < 0,001$
Die Abbildung zeigt, dass lediglich die Inkubationsdauer blanken NR's in Zellkulturmedium Einfluss auf die Adhäsion von PBMC an NR hat

5.7.2 Thrombozytenadhäsion

Die Thrombozytenadhäsion an EC unterschied sich nicht statistisch signifikant in Abhängigkeit von Fibroblasten preseeding und Inkubationszeit. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch für blankes NR in Abhängigkeit der Inkubationsdauer gezeigt werden. Wie bei der Adhäsion inflammatorischer Zellen (siehe 4.6.1) führte die achttägige Inkubation von Rinderperikard in Zellkulturmedium auch zu einem Anstieg der Adhäsion von Thrombozyten im Vergleich zur vierundzwanzigstündigen Inkubation. Es handelt sich hierbei um einen Anstieg um den Faktor $2,0 \pm 0,2$ bei $p < 0,001$ (Abb.21). Um den Faktor der Reduktion der Thrombozyten Adhäsion zu ermitteln, wurde endothelialisiertes, mit blanken NR verglichen. Die blanken Proben wurden für den gleichen Zeitraum in Zellkulturmedium inkubiert, den die Endothelialisierung in Anspruch nahm, also 8 Tage bei Fibroblasten preseeding und 24 Stunden bei hyperkonfluenter Aussaat. Da die verlängerte Inkubation von blanken NR in Medium eine vermehrte Thrombozyten Bindung zu Folge hatte, preseeding von Fibroblasten aber keinen Unterschied zur hyperkonfluenten Aussaat zeigte, ergab sich für nach

Fibroblasten preseeded endothelialisiertes NR ein grösserer Reduktionsfaktor der Thrombozytenadhäsion verglichen mit durch hyperkonfluente Aussaat endothelialisiertes NR (Faktor $3,0 \pm 0,5$ vs $1,6 \pm 0,3$).

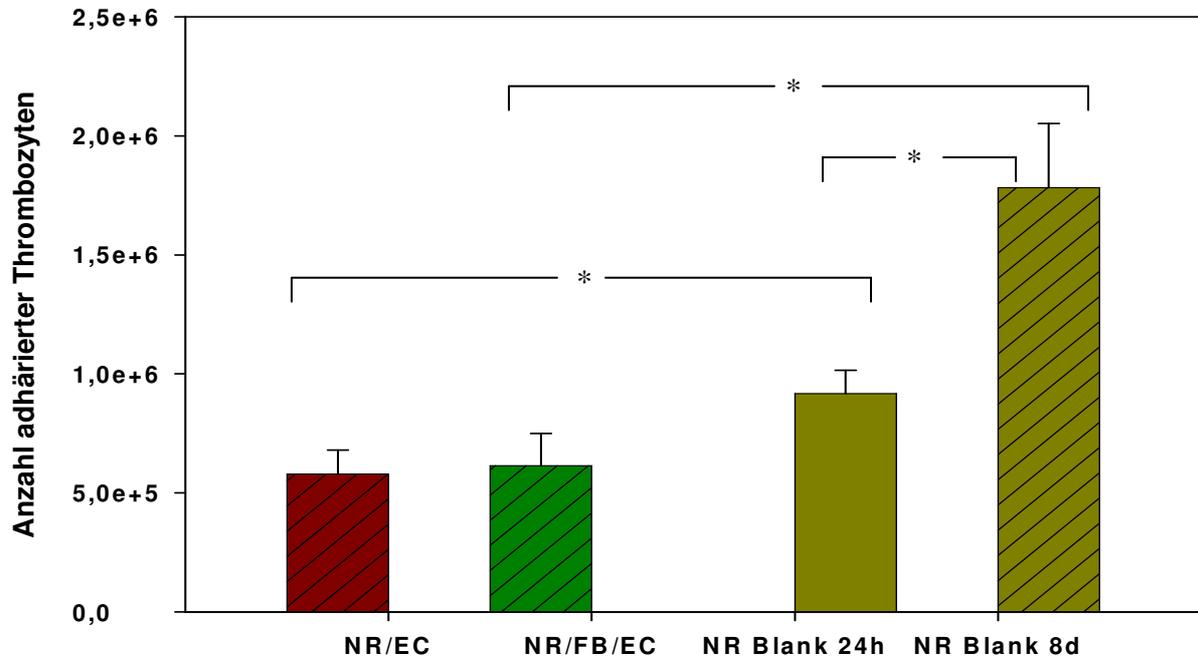


Abb. 29: Adhäsion von Thrombozyten an endothelialisiertes und blankes Rinderperikard (NR = Rinderperikard, FB = Fibroblasten, EC = Endothelzellen, 8d = 8-tägige Inkubation, 24h = 24-stündige Inkubation), * $p < 0,001$

5.7.3. Prostacyclin Sekretion

Verglichen wurde die Prostacyclin Sekretion von EC nach Fibroblasten pre seeding mit direkt auf NR adhärenen Endothelzellen. Es zeigte sich, dass auf Fibroblasten gewachsene HSVEC verglichen mit direkt auf NR nach hyperkonfluenter Aussaat adhärenen HSVEC vermehrt Prostacyclin sekretieren. Der hierfür ermittelte Faktor betrug $4,7 \pm 2,7$ und erwies sich als statistisch signifikant ($p < 0,05$).

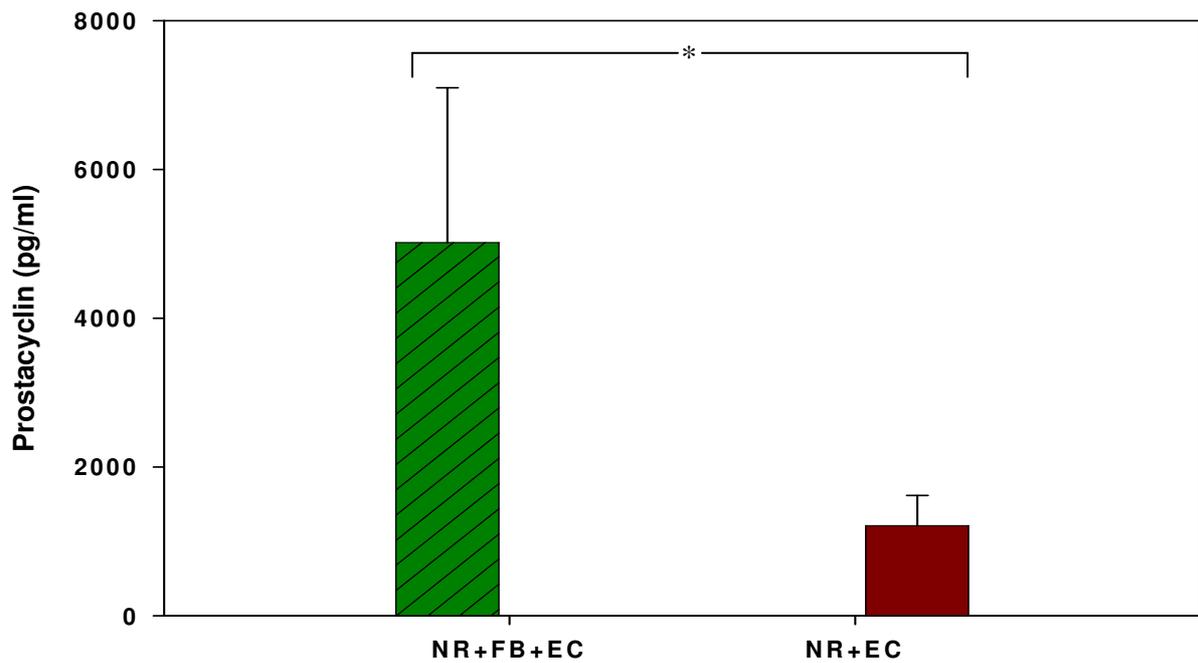


Abb. 30: Prostacyclin- Konzentration im Überstand von auf Rinderperikard adhärenen HSVEC (NR = Rinderperikard, FB = Fibroblasten, EC = Endothelzellen)
* $p < 0,05$

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit werden, ausgehend von der Annahme der maximalen Hämokompatibilität durch Endothel, Biomaterialien aus der klinischen Anwendung der kardiovaskulären Chirurgie auf ihr Endothelialisierungspotential hin untersucht. Mit Hilfe eines etablierten patienten-spezifischen Endothelzellmodells (Lehle et al. 2003) konnten verschiedene biologische Klappenmaterialien mit primären Endothelzellen der V. saphena magna besiedelt und auf ihre Funktion bezüglich der Kompatibilität zwischen Material und autologer Zelle untersucht werden.

Der erwartete Benefit der Endothelialisierung von Biomaterialien liegt in der Überlegung, dass empfängereigene Endothelzellen für eine optimale Interaktion der Materialoberfläche mit dem Blut sorgen. Dies ist jedoch nur durch vollständige Bedeckung des Biomaterials mit Endothel zu erreichen. Weiterhin ist bei xenogenen Materialien die vollständige Entfernung von zellulären Bestandteilen notwendig, einerseits, um immunogenes Potential zu eliminieren (Hopkins R 2005), andererseits, um zu vermeiden, dass residuale Zellen und Zellreste die Calcifizierung der Prothesen vorantreiben (Schoen FJ 2005). Wie wir in der vorliegenden Arbeit zeigen konnten, wirken sich unterschiedliche Detoxifizierungs- und Dezellularisierungsmethoden (Rieder E 2004) besonders auf die Endothelialisierung aus. So war es nicht möglich, Endothelzellen auf glutaraldehydfixiertem Rinderperikard anzusiedeln, wohingegen eine zusätzliche Detoxifizierung (Abolhoda A. 1996) eine Adhäsion der Zellen erlaubte. Weiterhin zeigte sich beim Vergleich Glutaraldehyd-fixierten Rinderperikards mit einer ebenso behandelten Mitralklappe vom Schwein, dass sich auf dem Herzklappenmaterial im Gegensatz zum Rinderperikard vitale Zellen zwar ausbreiteten, jedoch keinen Monolayer ausbildeten. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen ermöglichten die Überprüfung der vollständigen Dezellularisierung des Materials, sowie der Ausbildung eines konfluenten Monolayers durch die Endothelzellen. So stellte sich die Oberfläche des endothelialisierbaren NoReact-Rinderperikards zur Gänze dezellularisiert dar, weder ganze Zellen noch Zelltrümmer waren zu identifizieren. Allerdings fielen bei der Beurteilung von Querschnitten einige avitale Zellkerne in der Tiefe des Gewebes auf.

In einem konfluenten Monolayer organisierte vitale Endothelzellen liegen in vivo, wie auch unter Kulturbedingungen in ausgebreiteter Form vor, wobei die Zellgrenzen in alle Richtungen ineinander übergehen, hierdurch wird eine vollständige Bedeckung der subendothelialen Matrix gewährleistet (Esper RJ 2006). Ein Vergleich des blanken, beziehungsweise erfolgreich endothelialisierten Biomaterials mit einer humanen Mitralklappe

zeigte eine deutliche Annäherung an die physiologische Anatomie in vivo. Einschränkend ist zu bemerken, dass sich auf den die humane Mitralklappe bedeckenden Endothelzellen Mikrovilli finden, die auf endothelialisierten Biomaterial nicht nachweisbar waren. Dieser morphologische Marker metabolischer Aktivität (Ness W 1997) fehlte bei unseren Proben.

Ein Maß der Biokompatibilität endothelialisierter Biomaterialien stellt die Zelldichte dar, also die Zellzahl pro Quadratzentimeter als ein indirektes Maß für die Größe der Zellen (Sprague E 2005). Zellpathologische Vorgänge, beispielsweise die Induktion der Apoptose oder Nekrose, gehen mit Veränderungen im Zellvolumen einher (Maeno E 2006). Somit können Veränderungen im Zellvolumen, ausgedrückt durch eine veränderte Zelldichte auf derartige Veränderungen hinweisen. Die vergleichbare Zelldichte der Endothelzellen auf Glutaraldehyd-fixiertem und detoxifiziertem Rinderperikard (NR) und unter Kulturbedingungen gibt uns einen Hinweis auf ein Wohlbefinden der auf dem Biomaterial adhären Zellen. Eine Abschätzung des Zellvolumens der Zellen im Monolayer war nur durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen möglich, da die adhären Zellen trotz proteolytischen Verdau fest auf den Biomaterialien verankert blieben. Immunhistochemische Analysen zum Nachweis des endothelspezifischen von Willebrand Faktors (Manconi F 2000) an Querschnitten des besiedelten Biomaterials bestätigten ebenfalls die vollständige Endothelialisierung.

Die Bedeckung der subendothelialen Matrix gewährleistet lediglich eine passive Funktion. Die reine Präsenz von Endothelzellen nach Besiedelungsversuchen stellt kein ausreichendes Ergebnis dar, vielmehr müssen die Zellen auf ihre funktionelle Integrität hin untersucht werden (Remy-Zolghadri M 2004). Die aktive Funktion des Endothels wird unter anderen durch Sezernierung pro- und antiinflammatorischer Zytokine, pro- und antitrombogener Faktoren sowie durch Regulation membranständiger Adhäsionsmoleküle bewerkstelligt. Endothelzellen, die in einem proinflammatorischen, beziehungsweise prothrombogenen Status vorliegen, können die geforderten Aufgaben nicht erfüllen und sogar einen negativen Effekt auf die Hämokompatibilität kardiovaskulärer Prothesen ausüben (Chennazhy KP 2005, Simon P 2003).

Inflammatorischen Vorgängen wird ein Einfluss auf die limitierte Lebensdauer biologischer Herzklappenprothesen aufgrund struktureller Schädigung durch Verkalkung (Fann JI 1996, Human P 2001) zugeschrieben. Dies konnte sowohl im Tiermodell (Wilhelmi MH 2003), als auch in klinische Anwendung (Simon P 2003) gezeigt werden. Verantwortlich scheint hierfür eine residuale Immunogenität des dezellularisierten, xenogenen Materials zu sein (Rieder E

2005). Mittels Endothelialisierung der Prothesen würden immunogene Proteine durch körpereigene Zellen getarnt, inflammatorische Vorgänge reguliert, jedoch die Möglichkeit zu einer Abwehrreaktion erhalten bleiben. Dies setzt allerdings eine funktionell intaktes Endothel voraus.

Zur Untersuchung der inflammatorischen Funktionen wurden die Sekretion von Interleukin-6, einem proinflammatorischen Zytokin, das u. a. als prognostischer Marker bei kardiovaskulären Erkrankungen gilt (Kofler S 2005), sowie die Adhäsion von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) an auf Biomaterialien adhären Endothelzellen untersucht (Rieder E 2005). Adhären Endothelzellen auf NoReact-Material zeichneten sich durch eine erhöhte basale IL-6-Synthese aus, was auf einen aktivierten Grundzustand der Zellen hinweist. Die maximale Stimulierbarkeit der Zellen durch exogene Stimuli, wie z. B. TNF α (Esper 2006) war davon jedoch nicht betroffen. Der Nachweis membranständiger Adhäsionsmoleküle als weiteres Maß für den Aktivierungszustand der Zellen hingegen scheiterte an methodischen Problemen. Das etablierte System des zellulären Elisas zur Quantifizierung von Adhäsionsmolekülen ist nur für künstliche (Lehle et al 2003), nicht für biologische Biomaterialien geeignet. Ein unabhängiger funktioneller Test zur Adhäsion immunogener Zellen an Endothel auf Rinderperikard (NR) und unter Kulturbedingungen (PS) dagegen zeigte ein zur IL-6 Sekretion vergleichbares Ergebnis. Mittels TNF α ist eine Steigerung der inflammatorischen Aktivität der Endothelzellen auf beiden Materialien (NR und PS) zu erreichen, der Faktor dieser Aktivierung ist jedoch für direkt auf NR adhären Endothel eingeschränkt. Dies wurde als geminderte Funktionalität des Endothels auf Biomaterial gewertet.

Weiterhin wurde untersucht, ob mittels Endothelialisierung ein Schutz vor einer inflammatorischen Reaktion auf das xenogene Biomaterial zu erreichen ist. Die beobachtete vermehrte PBMC-Adhäsion an xenogenes Material nach Langzeitkultivierung des Biomaterials kann an den Dezellularisierungsprozess persistierender Immunogenität, oder an Adsorption im humanen Serum vorhandener proinflammatorischer Proteine liegen. Die Dezellularisierung xenogenen Materials führt somit nicht zu einem biologisch inerten Biomaterial, eine Beobachtung, die unlängst auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht wurde (Kasimir MT 2006). Bereits in der statischen Kultur verhindert eine Endothelialisierung die vermehrte Adhäsion inflammatorischer Zellen und bietet somit Schutz vor einer Schädigung des Biomaterials durch inflammatorische Reaktionen.

Da Antithrombogenität und die daraus folgende Verminderung thrombembolischer Ereignisse eine Grundvoraussetzung für die Funktionalität kardiovaskulärer Prothesen ist, stellt die

Endothelialisierung von xenogenen Biomaterialien diesbezüglich (Rashid ST 2004) eine Erfolg versprechende Maßnahme dar. Obwohl biologische Materialien ausreichend geringes thrombogenes Potential aufweisen, um auf eine lebenslange orale Antikoagulation zu verzichten, unterscheiden sich biologische Herzklappen ohne und mechanische Herzklappen mit oraler Antikoagulation nicht in der Inzidenz systemischer Embolien und Klappen Thrombosen, zwei Ereignisse hoher Mortalität (Hammermeister 1993). Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden, dass xenogenes dezellularisiertes Biomaterial zu einer Aktivierung humaner Thrombozyten führt (Kasimir MT 2005). Da Prostazyklin einen inhibierenden Effekt auf die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten ausübt (Douglas B. Cines 1998), wurde dessen endotheliale Freisetzung zur Untersuchung der antithrombogenen Eigenschaften herangezogen. Eine vergleichbare Prostazyklinsekretion von adhärennten Endothelzellen auf Polystyrol, wie auf Rinderperikard (NR) weist daraufhin, dass die Endothelzellen ihre antikoagulativen Eigenschaften in beiden Fällen behalten. Entsprechend der Untersuchung der inflammatorischen Eigenschaften wurde auch für die Thrombogenität ein funktioneller Test herangezogen, die Thrombozytenadhäsion an Biomaterial mit und ohne Endothelialisierung. Die Adhäsion von Thrombozyten an kardiovaskuläre Prothesen ist zum einen offensichtlich ungünstig, da sie den initialen Vorgang zu systemischer Embolisation und thrombotischen Versagen der Prothese darstellt, weiterhin sind jedoch koagulative und inflammatorische Vorgänge eng miteinander verknüpft (Marcel Levi 2004), so dass eine initiale Bindung von Thrombozyten eine inflammatorische Reaktion gegen das Biomaterial auslösen und so zu dessen kurz- und langfristiger Schädigung beitragen kann. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine Endothelialisierung sowohl von Kunststoff, als auch von dezellularisiertem Biomaterial (NR) zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenadhäsion führt. Eine vergleichbare Studie mit dezellularisierten porkinen Pulmonalklappe von Kasimir und Mitarbeitern (Kasimir et al 2005) bestätigt unser Ergebnis. Eine weitere Beobachtung war die vermehrte Adhäsion von Thrombozyten an nicht-endothelialisiertes bovines Perikard, nach achttägiger Inkubation in humanes Serum enthaltenden Zellkulturmedium. Eine Ursache hierfür könnte die Ablagerung prokoagulativer Serumproteine an das Material sein.

Die Untersuchungen zur Thrombogenität ergaben zusammengefasst eine erhaltene antithrombogene Wirkung der Endothelzellen sowohl bezüglich der Prostacyclin-Sekretion, als auch der Thrombozytenadhäsion, wobei die Endothelialisierung des Materials zu einer Reduktion der Thrombozytenadhäsion führte, die über mehrere Tage in Kultur stabil war und

somit auf einen bezüglich der Koagulation stabilen Funktionszustand der Endothelzellen hinweist.

Der funktionelle Erhalt eines adhärennten Endothelmonolayers auf Biomaterialien alleine reicht für eine biologische Abschätzung nicht aus. Hinsichtlich einer geforderten in vivo Endothelialisierung und der Notwendigkeit einer Regenerierbarkeit der Zellen bei Beschädigung der endothelialisierten Prothese muss die Möglichkeit der Proliferation gefordert werden. In der vorliegenden Studie war es in keinem Fall möglich, Endothelzellen direkt auf biologischen Materialien zu vermehren. Allerdings dürfte hier das Verfahren der Dezellularisierung und Detoxifizierung, das von den Herstellern als Produktionsgeheimnis bewahrt wird, eine bedeutende Rolle spielen.

Die Proliferation von Endothelzellen auf Biomaterial wurde erst durch vorangegangene Besiedelung mit (Myo-) Fibroblasten möglich. In vivo liegen Endothelzellen vaskulären (Myo-) Fibroblasten auf, diese beiden Zelltypen stehen über gap junctions und connexine in Verbindung (Griffith TM 2005). Weiterhin verfügen Endothelzellen über Rezeptoren für von (Myo-)Fibroblasten produzierte Matrixproteine (Song Li, 2005). So synthetisieren (Myo-) Fibroblasten sowohl Proteine zur Bildung der extrazellulären Matrix (Gulbins H 2003) als auch endotheliale Wachstumsfaktoren, beispielsweise VEGF (Coppe JP 2006). Beide Faktoren sind für die Angiogenese und die Proliferation von Endothelzellen von Bedeutung (Sankar S 1996), so dass hier die Ursache für die Induktion der Proliferation liegen könnte. Ein Hinweis hierfür sind die allerdings nur mit einer einzelnen HSVEC Kultur durchgeführten Versuche zum Thymidineinbau, die zeigten, dass eine Beschichtung von Rinderperikard (NR) mit Fibronectin und VEGF ebenso effektiv wie eine vorangegangene Besiedelung mit Fibroblasten die Proliferation von Endothelzellen induzieren kann. Dies steht auch in Einklang mit Untersuchungen von Balcells et al 2002. Funktionelle Studien wie oben für die adhärennten Endothelzellen beschrieben sind in Kokultur mit Fibroblasten nur bedingt möglich. So sind auch Fibroblasten in der Lage Interleukin-6 zu synthetisieren (Kofler S 2005). Damit wird eine Unterscheidung, ob eine durch Stimulation gesteigerte IL-6 Sekretion auf verbesserte Funktion der Endothelzellen durch Bildung einer subendothelialen Matrix, oder auf einen additiven Effekt durch eine höhere Anzahl IL-6-produzierender Zellen zurückzuführen ist, unmöglich gemacht.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Kokultivierung mit Fibroblasten, im Gegensatz zu alleine adhärennten Endothelzellen, keinen Einfluss auf den basalen Aktivierungszustand der Endothelzellen hatte. Weiterhin zeigte die Untersuchung zur Adhäsion von PBMC an

Endothelzellen in Kokultur mit (Myo-)Fibroblasten eine Verbesserung des TNF α induzierten Aktivierungsfaktors. Auch wurde das antithrombogen wirksamen Prostacyclin nach preseeding mit Fibroblasten verstärkt sezerniert. Dies wurde als Hinweis auf einen verbesserten funktionellen Status gewertet. Gleichzeitig war die Thrombogenität des Endothels durch die Kokultur nicht beeinflusst.

Die Besiedelung cardiovascularer Prothesen mit autologen Zellen zur Verbesserung der Haemokompatibilität ist nahe liegend und war bereits Gegenstand vieler Untersuchungen in unterschiedlichen Variationen (Vesely I 2005). Der zur Besiedelung herangezogene Zelltyp variierte von humanen Fibroblasten (Wilcox HE 2005), über adulte Endothelzellen, Endothelzellen aus der Nabelschnur (Punshon G 2005) bis hin zu endothelialen Progenitorzellen und in neuerer Zeit pluripotenten Stammzellen unterschiedlicher Herkunft (Siepe M 2008). Wir entschieden uns in dieser Arbeit für humane Vena saphena magna Endothelzellen, da sie bezüglich der Funktionalität den erwünschten Endzustand repräsentieren, ein etabliertes Modell zur Untersuchung dieser Funktionalität vorhanden war und dieser von herzchirurgischen Patienten isolierte Zelltyp bezüglich Verfügbarkeit und Wahrscheinlichkeit tatsächlich in vivo mit den Materialien in Kontakt zu kommen am realistischsten erschien.

Ein entscheidender Punkt in der Beurteilung besiedelter Biomaterialien ist die Identifizierung des adhärenen Zelltyps. Dies kann eindeutig sein, wenn die Besiedelung in vitro durchgeführt wurde und der verwandte Zelltyp vorbekannt ist, wird aber erheblich erschwert, wenn es sich um in vivo Versuche handelt. Einerseits kann es sich um eine in vivo Besiedelung handeln, in diesen Fall ist der Ursprung des Zelltyps weitestgehend unbekannt, andererseits kann bei vorbesiedelten, anschliessend implantierten Materialien eine Veränderung oder Austausch der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Der exakten Kenntnis des adhärenen Zelltyps kommt grosse Bedeutung zu, da der Zelltyp die Funktionalität bestimmt. Die bloße Präsenz humaner Zellen auf cardiovascularen Prothesen garantiert keineswegs eine durchschlagende klinische Verbesserung, einerseits da es sich um einen ungeeigneten Zelltyp handeln kann, andererseits, da ein geeigneter Zelltyp in ungünstigen Funktionszustand vorliegen kann. Aus diesen Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Funktionalität des adhärenen Endothels viel Aufmerksamkeit geschenkt.

In bisherigen Arbeiten folgte der in vitro Identifizierung humaner Endothelzellen zumeist der Tierversuch (Leukauf C 1993) ohne weiterer Evaluierung funktioneller Eigenschaften. Wurden Funktionen untersucht, dann entweder thrombogene (Kasimir MT 2005) oder inflammatorische beziehungsweise immunogene Eigenschaften (Rieder E 2005), eine

vollständige Untersuchung der für die Hämkompatibilität relevanten Eigenschaften wurden zumeist unterlassen. Ziel dieser Arbeit war es daher, unter anderen, Methodik zu etablieren, um die funktionellen Eigenschaften der Zellen vor Untersuchungen in einem Tiermodell evaluieren und optimieren zu können.

Die Rolle eines mehrschichtigen Besiedelungsmodells mit der Benutzung von Fibroblasten zur Synthese extrazellulärer Matrix liegt in erster Linie in der Induktion der Proliferation von Endothelzellen. Einen eindeutigen Nachweis von Proliferation adulter Endothelzellen auf unbehandeltem Biomaterial gelang weder uns noch ist er in der Literatur zu finden. Dem Wachstum der Zellen kommt jedoch grosse Bedeutung zu, da im Falle einer in vitro Besiedelung ein Transfer ohne Beschädigung des etablierten Monolayer sehr unwahrscheinlich ist. Eine Reperatur des Endothelzellrasens in vivo ist jedoch nur möglich, wenn Proliferation der Zellen auf dem zugrunde liegenden Material möglich ist. Wird eine primäre in vivo Endothelialisierung angestrebt ist Proliferation ohnehin unumgänglich. Ein weiterer Punkt, der für die Etablierung eines „Interlayers“ zwischen Biomaterial und Endothelzellen spricht ist die bereits im Durchflussmodell nachgewiesene erhöhte Resistenz gegen Scherkräfte (Gulbins H 2003). Die verbesserte Funktionalität bezüglich inflammatorischer Antwort und antithrombogener Potenz durch Fibroblasten preseeding spricht weiterhin für die Notwendigkeit von extrazellulärer Matrix für funktionell erfolgreiche Endothelialisierung. Die Ausbringung einzelner Proteine der extrazellulären Matrix zur Verbesserung der Zellularisierung von Biomaterialien wurde schon mehrfach untersucht (Balcells M 2002, Sales VL 2007). Der Einfluss dieses Vorgehens auf funktionelle Eigenschaften wurde bisher nicht untersucht. Ob die Etablierung der extrazellulären Matrix durch Fibroblasten (Lee YS 1993) oder durch seeding einzelner Proteine vorteilhafter bezüglich obengenannter Eigenschaften ist muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Bezüglich der klinischen Anwendbarkeit wäre das seeding einzelner Proteine vorteilhafter, da sich die zeitaufwendige Isolierung und Kultivierung der Fibroblasten erübrigen würde. Die Frage nach der Möglichkeit die komplexe Zusammensetzung subendothelialer extrazellulärer Matrix durch das Ausbringen einzelner Proteine funktionell ausreichend zu imitieren muss ebenfalls Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

Einfluss unterschiedlicher Vorbehandlungen biologischer Matrices auf inflammatorische und immunogene Reaktionen auf das Material wurden bereits beschrieben (Rieder E 2005). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass auch das Endothelialisierungspotential der Materialien abhängig von der Vorbehandlung ist. Einschränkend ist hier anzuführen, dass es sich um in

vitro Versuche handelt, die nur eine eingeschränkte Aussage über die Vorgänge in vivo zulassen.

Möglichkeiten für die klinische Anwendung endothelialisierter Biomaterialien bestehen in der kardiovaskulären Chirurgie mannigfaltig. So stellt die antithrombogene Oberfläche des Endothels einen wichtigen Faktor zur Ermöglichung eines kleinlumigen Gefässersatzes dar. Entsprechende Ergebnisse existieren bereits aus tierexperimentellen (Borschel GH 2005) und klinischen (Bordenave L 2005) Untersuchungen. Bedarf nach kleinlumigen Gefässprothesen besteht in der Herzchirurgie für Bypass-Grafts im Rahmen Aorto-Coronarer Bypassoperationen, sowie in der Gefässchirurgie in der Therapie der peripher arteriellen Verschlusskrankheit bei Patienten denen auf Grund venöser Erkrankungen oder Voroperationen die Vena saphena magna nicht mehr zu Verfügung steht. Ein weiterer Aspekt der für einen kleinlumigen Gefässersatz von der Stange spricht ist der Wegfall des Risikos für Wundheilungsstörungen an der Entnahmestelle, das besonders bei Patienten die unter Diabestes mellitus, peripher arterieller Verschlusserkrankung und Adipositas leiden hoch einzuschätzen ist (Fowler VG 2005, Olsen MH 2003). In diesen Fall muss jedoch ein der Vena sahena magna funktionell zumindest gleichwertiges Bypassmaterial gefordert werden.

Weiterhin sind endothelialisierte Oberflächen in der Anwendung von Herzunterstützungssystemen wünschenswert, da hier Thromboembolien, beziehungsweise Blutungskomplikationen auf Grund eines hohen Antikoagulationsbedarfes, die häufigsten Komplikationen darstellen (Hampton CR 2002). Einschränkend muss hier angemerkt werden, dass diese Komplikationen nicht ausschliesslich auf eine Gerinnungsaktivierung und Thrombozytenadhäsion durch die Fremdoberflächen zurückzuführen sind. Auch die individuelle Koaguabilität, das individuelle Ansprechen der Patienten auf antikoagulative und antithrombogene Medikation, sowie das Strömungsprofil des Blutes im Unterstützungssystem (Chan WK 2002) haben bedeutenden Einfluss auf die aufgeführten Komplikationen.

Ein weiteres Anwendungsgebiet stellt der Herzklappenersatz dar. Zwar bestehen hier bereits gute Lösungen, jedoch kann auch hier eine Endothelialisierung zur weiteren Reduktion thrombembolischer Komplikationen beitragen. Die Besiedelung künstlicher Materialien, beispielsweise ermöglicht durch eine Interlayer zwischen Material und autologen Zellen, könnte eine Reduktion der antikoagulativen Medikation bei erhaltener Haltbarkeit der Prothese ermöglichen. Ein weiterer Vorteil durch die Endothelialisierung ist bei Infektionen von Herzklappenprothesen zu erwarten. Zum einen als protektiver Faktor, da die Thrombozytenadhäsion als initialer pathophysiologischer Faktor im Verlauf der Endokarditis gesehen wird (Fitzgerald JR 2006) und in dieser und anderen Arbeiten eine Reduktion der

Thrombozytenadhäsionen an biologische Materialien durch Endothelzellen gezeigt werden konnte. Zum anderen konnte diese Arbeit zeigen, dass mittels Endothelialisierung eine geregelte Rekrutierung inflammatorischer Zellen ermöglicht wird, ein Vorgang der in der physiologischen Abwehr bakterieller Infektionen entscheidend ist.

7. Zusammenfassung

Cardiovaskuläre Prothesen werden in großer Zahl in der Therapie von Herzkreislaufkrankungen eingesetzt, jedoch ist die ideale Prothese bezüglich Thrombogenität und Haltbarkeit noch nicht gefunden. Tissue engineering, in diesen Fall die Besiedelung der cardiovaskulären Prothesen mit autologen Endothelzellen stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der Bio- und Haemokompatibilität besagter Prothesen dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst mehrere biologischen Materialien in klinischer Anwendung auf ihr Endothelialisierungspotential mittels Besiedelung durch HSVEC untersucht. Das am Besten geeignete Material wurde für die weiteren Untersuchungen verwandt. Es wurde die Funktionalität des adhärenen Endothels bezüglich Proliferation, Metabolismus, Inflammation und Thrombogenität untersucht.

Hierbei fiel auf, dass lediglich Adhärenz, jedoch keine Proliferation der HSVEC auf dem untersuchten Biomaterial zu erreichen war, dazu passend zeigten die Zellen einen eingeschränkten Metabolismus. Die HSVEC waren in der Lage auf einen inflammatorischen Stimulus zu reagieren, zeigten jedoch einen eingeschränkten Aktivierungsfaktor bei erhöhten basalen Aktivierungszustand. Die thrombogenen oder vielmehr antithrombogenen Eigenschaften des Endothels auf Biomaterial waren unverändert.

Um eine Verbesserung der beschriebenen funktionellen Einschränkungen und eine weitere Annäherung an die physiologische Anatomie zu erreichen, wurden, sozusagen schichtweise, zunächst vaskuläre (Myo-)Fibroblasten und darauf folgend HSVEC auf das Biomaterial ausgesät. Dies führte zu einer Induktion der Proliferation der Endothelzellen und verbesserte die Reaktion auf die inflammatorische Stimulation bei gleichbleibenden antithrombogenen Eigenschaften.

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Besiedelung mit Endothelzellen zu einem Schutz, beziehungsweise einer Regulation, der Adhäsion von Thrombozyten und inflammatorischen Zellen an das Biomaterial führt. Dieser Effekt war mit zunehmender Dauer der Inkubation unter Kulturbedingungen ausgeprägter.

Die beschriebenen Effekte lassen den Schluss zu, dass Endothelialisierung einen positiven Effekt auf die Bio- und Hämokompatibilität biologischer Materialien hat und dieser Effekt durch preseeding mit Fibroblasten weiter verbessert werden kann.

8. Ausblick

Die Einschränkung der vorliegenden Arbeit liegt darin, dass die Experimente im statischen Zellkulturmodell durchgeführt wurden. Untersuchungen im Durchflussmodell (Gulbins H 2003) ermöglichen in Zukunft die Untersuchung der Zellen unter Flussbedingungen. Die Frage bleibt offen, ob die Endothelzellen auf dem Biomaterial auch im Durchfluss adhärent bleiben, beziehungsweise welchen Einfluss Kokultivierung mit (Myo-) Fibroblasten auf die Resistenz von Endothelzellen auf Biomaterialien gegen Scherkräfte hat.

Ein zweiter Punkt der die Untersuchung unter Flussbedingungen interessant macht, liegt in der Tatsache, dass Scherkräfte den funktionellen Status von Endothelzellen im Sinne einer Beeinflussung der Genexpression in Richtung eines vasoprotektiven Phänotyps verändern (Makek AM 1999).

Das hier untersuchte Material ist auch als Arteria thoracica interna vom Rind verfügbar, so dass sich auch Untersuchungen zur Endothelialisierung kleinlumiger Gefäße zur Verbesserung der Haemokompatibilität anbieten würden (Rashid ST 2004).

Weiterhin gibt es aus Vorversuchen Hinweise, dass Beschichtung des Biomaterials mit Fibronectin und VEGF den gleichen, oder einen dem preseeding mit (Myo-)Fibroblasten ähnlichen Effekt auf die proliferativen Eigenschaften von Endothelzellen hat. Zukünftige Untersuchungen müssen den Einfluss des Beschichtens auf die Haemokompatibilität des Materials und die Funktionalität darauf adhärenter Endothelzellen zeigen.

Auch würde eine Untersuchung der Ursache für die vermehrte Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an das Biomaterial nach Inkubation in serumhaltigen Zellkulturmedium von Interesse sein, da es Hinweise gibt dass die Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten durch xenogenes Material der in situ Endothelialisierung im Wege steht und eine Rolle in der Pathophysiologie des Langzeitversagens dieser Materialien spielt (Kasimir MT 2005).

Schließlich wäre weiterhin zu untersuchen, welcher Zelltyp am besten für eine Besiedelung der Materialien geeignet ist. Pluripotente Stammzellen verschiedener Herkunft stellen hierbei ein attraktives Konzept dar (Frasier WH 2005, Planat-Benard V 2004).

9. Literatur

Abolhoda A, Yu S, Oyarzun R, Allen KR, McCormick J, Han S, Kemp FW, Bogden JD, Lu Q, Gabbay S (1996). "No-React Detoxification Process: A Superior Anticalcification Method for Bioprostheses." *Ann Thorac Surg* 62: 1724-30.

Balcells M, Edelmann ER (2002). "Effect of pre-adsorbed proteins on attachment, proliferation, and function of endothelial cells." *J Cell Physiol* 191(2): 155-161.

Biasucci LM, Vitelli A., Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuffi AG, Ciliberto G, Maseri A (1996). "Elevated Levels of Interleukin-6 in Unstable Angina." *Circulation* 94: 874-877.

Bombeli T, Meller M., Haeberli A (1997). "Anticoagulant properties of the vascular endothelium." *Thromb Haemost.* 77: 408.

Bordenave L, Fernandez P, Remy-Zolghadri M, Villars S, Daculsi R, Midy D (2005). "In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization." *Clin Hemorheol Microcirc.* 33: 227-234.

Borschel GH, Huang YC, Calve S, Arruda EM, Lynch JB, Dow DE, Kuzon WM, Dennis RG, Brown DL (2005). "Tissue engineering of recellularized small-diameter vascular grafts." *Tissue Eng.* 11: 778-786

Cannegieter SC, Rosendaal FR., Briet E (1994). "Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses." *Circulation* 89(2): 635-641.

Chan WK, Wong YW, Yu SC, Chua LP (2002). "A computational study of the effects of inlet guide vanes on the performance of a centrifugal blood pump." *Artif Organs* 26: 534-542.

Chennazhy KP, Krishnan LK (2005). "Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering." *Biomaterials* 26: 5658-5667.

Chiu JJ, Chen LJ., Shu Chien (2003). "Shear stress inhibits adhesion molecule expression in vascular endothelial cells induced by coculture with smooth muscle cells." *Hemostasis, Thrombosis and Vascular Biology* 101(7): 2667-2674.

Cines DB, Pollak ES., Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM (1998). "Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders." *Blood* 91(10): 3527-3561.

Cohn LH, Edmunds LM (2003). *Cardiac Surgery in the Adult*, McGraw-Hill Professional Publishing.

Cohn LH, Farivar SF (2003). "Hypercholesterolemia is a risk factor for bioprosthetic valve calcification and explantation." *J Thoracic Cardiovasc Surg* 126: 969-976.

Coppe JP, Kauser K., Campisi J, Beausjour CM (2006). "Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence." *J Biol Chem.* 281(40): 29568-74

Dahm M, Prufer D., Mayer E, Hafner G, Groh E, Oelert H (1996). "Effects of surface seeding with vital cells on the calcium uptake of biological materials for heart valve replacement." *J Heart Valve Dis.* 5(2): 148-151.

David TE, Ivanov J (2003). "Is degenerative calcification of the native aortic valve similar to calcification of bioprosthetic heart valves?" *J Thoracic Cardiovasc Surg* 126: 939-941.

De Clerk L, Bridts C., Mertens A, Moens M, Stevens W (1994). "Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function." *J Immunol Meth* 172: 115-124.

Drenkhahan D, Ness W. (1997). *Vascular Endothelium. Physiology, Pathology and Therapeutical Oppertunities.* Stuttgart, Schattauer Verlag.

Emery RW, Krog CC., Arom KV, Emery AM, Benyo-Albrecht K, Joyce LD, Nicoloff DM (2005). "The St. Jude Medical Cardiac Valve Prosthesis: A 25-Year Experience With Single Valve Replacement." *Ann Thorac Surg* 79(3): 776-783.

Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA (2006). "Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal." *Cardiovascular Diabetology* 5(4).

Fann JI, Miller DC., Moore KA, Mitchell RS, Oyer PE, Stinson EB, Robbins RC, Reitz BA, Shumway NE (1996). "Twenty-year clinical experience with porcine bioprostheses." *Ann Thorac Surg* 62: 1302-1312.

Feletou M, Vanhoutte PM. (2006). "Endothelial Dysfunction: a Multifaceted Disorder." *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291(3): H985-1002.

Flameng W (2004). "A new approach to heart valve tissue engineering." *Int J Cardiol* 95(Suppl.1): 55-56.

Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* 4: 445-457.

Fowler VG, O'Brien SM, Muhlbaier LH, Corey GR, Ferguson TB, Peterson ED. Clinical predictors of major infections after cardiac surgery. *Circulation* 112: I358-365.

Gorbet MB, Sefton MV (2004). "Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes." *Biomaterials* 25(26): 5681-5703.

Grabenwoger M, Sider J., Fitzal F, et al. (1996). "Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material." *Ann Thorac Surg* 62(3): 772-777.

Griffith TM, Chaytor AT., Bakker LM, Edwards DH (2005). "5-Methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin can modulate electrotonically mediated endothelium-dependent vascular relaxation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(19): 7008-70013.

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

Gulbins H, Pritisinac A., Petzold R, Goldemund A, Doser M, Dauner M, Meiser B, Reichart B, Daebritz S (2005). "A low-flow adaptation phase improves shear-stress resistance of artificially seeded endothelial cells." *Thorac Cardiovasc Surg.* 53(2): 96-102.

Hammermeister K E., Sethi GK., Henderson WG., Oprian C, Kim T, Rahimtoola S (1993). "A Comparison of Outcomes in Men 11 Years after Heart-Valve Replacement with a Mechanical Valve or Bioprosthesis." *N Engl J Med* 328: 1289-1296.

Hammermeister K, Sethi GK., Henderson WG, Grover FL, Oprian C, Rahimtoola SH (2000). "Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial." *J Am Coll Cardiol* 36(4): 1152-1158.

Hampton CR, Verrier ED (2002). Systemic consequences of ventricular assist devices: alterations of coagulation, immune function, inflammation, and the neuroendocrine system. *Artif Organs.* 26:902-908.

Heydarkhan S, Helenius G., Johansson B, Li J, Mattson E, Risberg B (2003). "Co-Culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors." *J Cell Biochem* 89: 1250-1259.

Hopkins RA (2005). "Tissue Engineering of Heart Valves." *Circulation* 111: 2712-2714.

Human P, Zilla P (2001). "Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure." *Ann Thorac Surg* 71: 385-388.

Kanter KR, Budde JM., Parks WJ, Tam VK, Sharma S, Williams WH, Fyfe DA (2002). "One hundred pulmonary valve replacements in children after relief of right ventricular outflow tract obstruction." *Ann Thorac Surg* 73(6): 1801-1806.

Kasimir MT, Rieder E., Seebacher G, Nigisch A, Dekan B, Wolner E, Weigl G, Simon P (2006). "Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves." *J Heart Valve Dis* 12(2): 278-286.

Kasimir MT, Weigl G., Sharma J, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, Simon P (2005). "The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation." *Thromb Haemost* 94(3): 562-567.

Kofler S, Nickel T., Weis T (2005). "Role of cytokines in cardiovascular disease: a focus on endothelial response to inflammation." *Clinical Science* 108: 205-213.

Koolbergen DR, Hazekamp MG., de Heer E, van Hoorn F, Huysmans HA, Bruijn JA , Dion RA(2002). "Structural degeneration of pulmonary homografts used as aortic valve substitute underlines early graft failure." *Eur J Cardiothorac Surg* 22(5): 802-807.

Langer R, Vacanti JP (1993). "Tissue Engineering." *Science* 260: 920-926.

Lee YS, Park DK, Kim YB, Seo JW, Lee KB, Min BG (1993). Endothelial cell seeding onto the extracellular matrix of fibroblasts for the development of a small diameter polyurethane vessel. *ASAIO J* 39: M740-745.

Lehle K, Buttstaedt J., Birnbaum DE (2003). "Expression of adhesion molecules and cytokines in vitro by endothelial cells seeded on various polymer surfaces coated with titaniumcarboxonitrite." *J Biomed Mater Res* 65(3): 393-401.

Leukauf C, Szeles C, Salaymeh L, Grimm M, Grabenwöger M, Losert U, Moritz A, Wolner E (1993). In vitro and in vivo endothelization of glutaraldehyde treated bovine pericardium. *J Heart Valve Dis.* 2: 230-235.

Levi M, van der Poll T, Büller HR (2004). "Bidirectional Relation Between Inflammation and Coagulation." *Circulation* 109: 2698-2704.

Li S, Huang NF, Hsu S (2005). "Mechanotransduction in Endothelial Cell Migration." *J Cell Biochem*(96): 1110-1126.

Madge L, Pober J. (2001). "TNF Signaling in Vascular Endothelial Cells." *Exp. Mol. Pathol* 70: 317-325.

Maeno E, Shimizu T., Okada Y (2006). "Normotonic cell shrinkage induces apoptosis under extracellular low Cl conditions in human lymphoid and epithelial cells." *Acta Physiol* 187(2): 217-222.

Makek AM, Alper SL, Izumo S (1999). "Haemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis." *JAMA* 282: 2035-2042.

Manconi F, Markham F., Fraser I (2000). "Culturing endothelial cells of microvascular origin." *Methods Cell Sci* 22(2-3): 89-99.

Marchand MA, Aupart MR, Norton R, Goldsmith IR, Pelletier LC, Pellerin M, Dubiel T, Daenen WJ, Herijgers P, Casselman FP, Holden MP, David TE (2001). "Fifteen-year experience with the mitral Carpentier-Edwards PERIMOUNT pericardial bioprosthesis." *Ann Thorac Surg* 71(Suppl. 1): 236-239.

McGrath LB, Fernandez J., Laub GW, Anderson WA, Bailey BM, Chen C (1995). "Perioperative events in patients with failed mechanical and bioprosthetic valves." *Ann Thorac Surg* 60(Suppl. 2): 475-478.

Mol A, Hoerstrup S. (2004). "Heart valve tissue engineering-Where do we stand." *Int J Cardiol* 95(Suppl. 1): 57-58.

Olsen MH, Sundt TM, Lawton JS, Damiano RJ, Hopkins-Broyles D, Lock-Buckley P, Fraser VJ (2003). Risk factors for leg harvest surgical site infections after coronary artery bypass graft surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 126: 992-999.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L (2004). "Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells: Physiological and Therapeutic Perspectives." *Circulation* 109: 656-663.

Punshon G, Vara DS; Sales KM, Kidane AG, Salacinski HJ, Seifalian AM (2005). "Interactions between endothelial cells and a poly(carbonate-silesquioxane-bridge-urea)urethane. *Biomaterials* 26: 6271-6279.

Rashid ST, Salacinski HJ, Fuller BJ, Hamilton G, Seifalian AM (2004). "Engineering of bypass conduits to improve patency." *Cell Prolif.* 37: 351-366.

Rémy-Zolghadri M, Laganier J, Oligny JF, Germain L, Auger FA (2004). "Endothelium properties of a tissue-engineered blood vessel for small-diameter vascular reconstruction." *J Vasc Surg* 69(3): 613-620.

Rieder E, Kasimir MT., Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, Weigel G (2004). "Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells." *J Thoracic Cardiovasc Surg* 127: 399-405.

Rieder E, Seebacher G., Kasimir MT, Eichmair E, Winter B, Dekan B, Wolner E, Simon P, Weigel G (2005). "Tissue Engineering of Heart Valves: Decellularized Porcine and Human Valve Scaffolds Differ Importantly in Residual Potential to Attract Monocytic Cells." *Circulation* 111: 2792-2797.

Sales VL, Engelmayer GC Jr, Johnson JA Jr, Gao J, Wang Y, Sacks MS, Mayer JE Jr (2007). Protein precoating of elastomeric tissue-engineered scaffolds increased cellularity, enhanced extracellular matrix protein production, and differentially regulated the phenotypes of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 116: I55-63

Sankar S, Brooks NM, Bensen L, McCarthy TL, Centrella M, Madri JA (1996). "Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis." *J Clin Invest* 97: 1436.

Sarraf CE, Harris AB, McCulloch AD, Eastwood M (2003). "Heart valve and arterial tissue engineering." *Cell Prolif.* 36(5): 241-254.

Siepe M, Akhyari P, Lichtenberg A, Schlensak C, Beyersdorf F (2008). Stem cells used for cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothoracic Surg.*

Schinke T, McKee MD, Karsenty G (1999). "Extracellular matrix calcification: where is the action?" *Nature* 21: 150-151.

Schoen FJ, Levy RJ (2005). "Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention." *Ann Thorac Surg* 79: 1072-1080.

Schoen FJ, Levy RJ. (1999). "Tissue heart valves: Current challenges and future research perspectives." *J Biomed Mater Res* 47(4): 439-465.

Schoen FJ, Tsao JW, Levy RJ (1986). "Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve prosthesis. Implications for mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization." *Am J Pathol* 23(1): 143-154.

Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner E (2003). "Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT™ in pediatric patients." *Eur J Cardiothorac Surg* 23: 1002-1006.

Sprague EA, Palmaz JC., MD (2005). "A Model System to Assess Key Vascular Responses to Biomaterials." *J Endovasc Ther* 12(5): 594-604.

Stock U, Schenke-Layland K. (2006). "Performance of decellularized xenogeneic tissue in heart valve replacement." *Biomaterials* 27: 1-2.

Sullivan GW, Sarembock IJ., Linden J (2000). "The role of inflammation in vascular diseases." *J Leukocyte Biol* 67(5): 591-602.

Sutherland FW, Perry TE., Yu Y, Sherwood MC, Rabkin E, Masuda Y, Garcia GA, McLellan DL, Engelmayr GC, Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE. (2005). "From Stem Cells to Viable Autologous Semilunar Heart Valve." *Circulation* 111(21): 2783-2791.

Teebken OE, Wilhelmi M, Haverich A (2005). "Tissue Engineering für Herzklappen und Gefäße." *Der Chirurg* 76(5): 453-466.

Tull S, Anderson S., Hughan S, Watson S, Nash G, Rainger G (2006). "Smooth muscle cells promote adhesion of platelets to cocultured endothelial cells." *Circ Res* 98: 98-104.

Vattikuti R, Towler DA (2004). "Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: 686-696.

Vesely I. (2005). "Heart Valve Tissue Engineering." *Circ Res* 97(8): 743-755.

Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, Ingham E (2005). Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Valve Dis* 14: 228-236.

Wilhelmi MH, Rebe P., Leyh R, Wilhelmi M, Haverich A, Mertsching H (2003). "Role of inflammation and ischemia after implantation of xenogeneic pulmonary valve conduits: Histological evaluation after 6 to 12 months in sheep." *Int J Artif Organs* 26: 411-420.

Yacoub MH, Cohn. LH (2004). "Novel Approaches to Cardiac Valve Repair: From Structure to Function: Part I." *Circulation* 109: 942-950.

Yacoub MH, Takkenberg JJM (2005). "Will heart valve Tissue engineering change the world." *Nature Clin Prac* 2.

10. Publikationen aus der Arbeit

4 th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society

EVALUATION OF ENDOTHELIAL CELL PROPERTIES AFTER ADHESION TO
DECELLULARIZED BIOMATERIALS

Simon Schopka, Franz-Xaver Schmid, Daniel Reitenberger, Dietrich E. Birnbaum,
Karla Lehle

Clinic of Cardiothoracic Surgery, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11,
93042 Regensburg, Germany

BACKGROUND: Decellularized biomaterials are used in cardiovascular surgery because of their favourable properties concerning thrombogenicity, though their use is limited due to degeneration of the material. Endothelial cell seeding is considered a promising way to improve biomaterial performance. The aim of this study was to compare in vitro biological responses of human endothelial cells seeded on different materials.

METHODS: Endothelial cells were isolated from human saphenous veins (HSVEC) of patients undergoing coronary bypass grafting. Different acellularized glutaraldehyde crosslinked and detoxified tissue materials (bovine pericardium and porcine aortic valve) in clinical usage were seeded with HSVEC under static culture conditions. Confluent EC monolayers were evaluated for cell density, metabolism (MTT), antiinflammatory (IL-6 secretion, PBMC adhesion) and antithrombotic (thrombocyte adhesion) properties compared to tissue-cultured polystyrene.

RESULTS: Scanning electronic microscopy showed a confluent monolayer on bovine pericardium (NoReact, NR) and porcine aortic valve with surprisingly strong attachment to the biomaterial. Functional analysis of HSVEC adherent to NR resulted in a significant decrease of metabolic activity by a factor of 2.5 ± 0.5 . In addition, cells showed reactivity to a physiologic stimulus (TNF) concerning IL-6 secretion (increase by a factor of 3.5 ± 1.1) and adhesion of peripheral blood mononuclear cells (factor 1.4 ± 0.3), though basal secretion and adherence were increased in both cases compared to polystyrene (factor 4.5 ± 2.5 for IL-6 and factor 1.4 ± 0.5 for PBMC adhesion). Furthermore HSVEC seeding resulted in a decrease of thrombocyte adhesion to biomaterial (factor 2.1 ± 0.6).

CONCLUSIONS: HSVEC adherent to NR are able to change their inflammatory functional status resulting in maximum activity similar to HSVEC under cultural conditions, though they show increased basal inflammatory activity. Adherent cells also reveal typical EC function by reducing thrombogenicity.

Strategies in Tissue Engineering

2nd International Conference 2006

EVALUATION OF ENDOTHELIAL CELL PROPERTIES AFTER CO-CULTIVATION WITH FIBROBLASTS ON DECELLULARIZED BIOMATERIAL

Simon Schopka, Franz-Xaver Schmid, Dietrich E. Birnbaum, Karla Lehle

Clinic of Cardiothoracic Surgery, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93042 Regensburg, Germany

BACKGROUND: Decellularized biomaterials are used in cardiovascular surgery because of their favourable properties concerning thrombogenicity, though their use is limited due to degeneration of the material. Endothelial cell seeding is considered a promising way to improve biomaterial performance. The aim of this study was to compare in vitro biological responses of human endothelial cells seeded on decellularized bovine pericardium.

METHODS: Endothelial cells were isolated from human saphenous veins (HSVEC) of patients undergoing coronary bypass grafting. Decellularized glutaraldehyde crosslinked and detoxified tissue material (bovine pericardium) in clinical usage was seeded with HSVEC under static culture conditions. Confluent EC monolayers were evaluated for cell density, metabolism (MTT), antiinflammatory (IL-6 secretion, PBMC adhesion) and antithrombotic (thrombocyte adhesion, 6-keto Prostaglandin F1 α secretion) properties compared to tissue-cultured polystyrene. Furthermore effects of fibroblast preseeding on HSVEC proliferation (3HTymidin incorporation) and functional properties (PBMC, thrombocyte adhesion, 6-keto Prostaglandin F1 α secretion) have been studied.

RESULTS: Scanning electronic microscopy showed a confluent monolayer on bovine pericardium with surprisingly strong attachment to the biomaterial and a cell density comparable to that of HSVEC on Polystyrene. Functional analysis of HSVEC adherent to bovine pericardium resulted in a significant decrease of metabolic activity by a factor of 2.5 +/- 0.5. In addition, cells showed reactivity to a physiologic stimulus (TNF) concerning IL-6 secretion (increase by a factor of 3.0 +/- 2.0) and adhesion of peripheral blood mononuclear cells (factor 1.4 +/- 0.3), though induction factor by TNF was impaired in both cases compared to HSVEC on polystyrene. Furthermore HSVEC seeding resulted in a decrease of thrombocyte adhesion to biomaterial (factor 2.1 +/- 0.6). 6-keto Prostaglandin F1 α secretion was similar to that of HSVEC on Polystyrene. Preseeding of bovine pericardium with human aortic fibroblasts resulted in an increased 3HTymidin incorporation of HSVEC (factor 11 +/- 4.3), as well as an 13% increase of TNF induced PBMC adhesion compared to HSVEC adherent to bovine pericardium without fibroblasts. Apart from that HSVEC secreted 4.1 +/- 2.3 fold more 6-keto Prostaglandin F1 α after fibroblast preseeding. Thrombocyte adhesion to HSVEC did not differ after fibroblast preseeding.

CONCLUSIONS: HSVEC adherent to bovine pericardium are able to change their inflammatory functional status resulting in maximum activity similar to HSVEC under cultural conditions, though they show impaired TNF reactivity. Adherent cells also reveal typical EC function by reducing thrombogenicity. Preseeding with fibroblasts induces proliferation of HSVEC on bovine pericardium and improves functional properties of adherent HSVEC.

Article: 4.008 words (Abstract to References), title 15 words,
abstract 194 words, 4 Figures

TITLE: **Recellularization of biological heart valves with human vascular
cells: In vitro hemocompatibility assessment**

Authors: Simon Schopka¹, Franz-Xaver Schmid¹, Stephan Hirt¹,
Dietrich E. Birnbaum¹, Christof Schmid¹, Karla Lehle¹

Affiliation: Dept. of Cardiothoracic Surgery, University Hospital Regensburg,
D-93042 Regensburg, Germany

Running head: Hemocompatibility assessment of recellularized biological heart
valves

Correspondence to: Dr. rer. nat. Karla Lehle
Dept. of Cardiothoracic Surgery, University Hospital
Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11,
D-93042 Regensburg, Germany
phone: +49-(0)941-9449901
fax: +49-(0)941-9449902
e-mail: Karla.Lehle@klinik.uni-regensburg.de

ABSTRACT

Coverage of cardiovascular bioprostheses with autologous endothelium is used for the purpose of improving blood compatibility. Aim of our study was to analyze endothelialization potential of glutaraldehyde-fixed heart valves, cellular functions of seeded endothelial cells (EC) and the impact of a two-stage seeding protocol using human fibroblasts (FB) and EC from saphenous veins (HSVEC) on functional properties. Adherence and morphology of adhered cells were assessed by scanning electronic microscopy and immunohistochemistry. A reproducible complete coverage of the surface with EC was established on glutaraldehyde-fixed and decellularized bovine pericardium. Analyzing functional properties of directly adhered cells revealed non-proliferative cells, which were capable of maximum inflammatory stimulation in terms of increased interleukin-6 secretion and adhesion of inflammatory cells. Furthermore, EC showed sustained anti-thrombotic properties quantified by platelet adhesion onto EC and prostacyclin secretion of EC. Preseeding with vascular myofibroblasts using a two-stage seeding protocol resulted in induction of EC proliferation and improved inflammatory and anti-thrombotic functions. Cardiovascular biomaterials differ largely in their potential to allow adhesion of human EC. Successfully endothelialized biomaterial revealed cellular properties which might be favourable to improve performance of biomaterials. Two-stage seeding adds regenerative potential and improves cell functions of adherent EC.

Keywords: endothelial cells, decellularized bovine pericardium, functional analysis, pre-seeding, fibroblasts

INTRODUCTION

The incidence and prevalence of heart valve disease is increasing worldwide and although valve repair is currently the preferred method of treating patients with severe heart disease. A large number of valves are not suitable for repair and therefore require replacement.¹ However, prostheses have severe limitations. Mechanical prostheses have a significant risk of thromboembolism and thrombotic occlusion, which requires lifelong anticoagulation therapy with the risk of hemorrhagic complications. The advantage offered by mechanical prosthesis is their durability.^{2,3} Biological tissue valve prostheses (e.g. glutaraldehyde (GA)-fixed xenografts and cryopreserved homografts) suffer from limited durability and dysfunction due to progressive tissue degeneration.^{4,5} Therefore, successive surgery to replace the prostheses might be necessary.⁶ The etiology for dysfunction of GA-fixed tissue valve prostheses is degeneration of grafts with subsequent calcification and tissue failure.⁷ This results from manufactural steps for example GA-crosslinking⁸ as well as an inability of host cells to repopulate the valve.⁶

Tissue engineering of biological tissue valve prosthesis using autologous cells might be a promising way to overcome these limitations. Valve degeneration and thromboembolic events may be reduced by covering the surface of valve prostheses with autologous EC.⁹ However, stable EC layers have not been formed successfully on GA-fixed valves due to their inability to repopulate.^{10,11} Pretreatment of the prostheses with an amino acid or citric acid, precoating with fibronectin or growth factors and preseeding with fibroblasts represent efforts that have been undertaken to improve biomaterial repopulation.^{12,13}

The purpose of this study was to develop a seeding strategy to cover the luminal surface of the prostheses and to evaluate cellular functions of adherent cells under in vitro conditions. Detoxified and untreated GA-fixed bioprosthetic prostheses were

recellularized with myofibroblasts and HSVEC to analyze attachment, proliferation, metabolic activity, viability and adherence of inflammatory cells and platelets. Cell-seeded leaflets were also analyzed by histology and scanning electron microscopy.

MATERIALS AND METHODS

Biomaterial

Glutaraldehyde (GA) cross-linked porcine mitral valve (Carpentier-Edwards Mitral Porcine Bioprosthesis, CEMP), GA cross-linked bovine pericardium (Carpentier-Edwards Perimount Plus Perikard-Bioprosthesis, CEPP), and GA cross-linked and detoxified bovine pericardium (Shelhigh No-React® VascuPatch™, NR) were extensively washed in sterile, isotonic phosphate buffered saline (PBS; 3x 5 minutes) according to product inserts. For growth analyses and verification of functional properties of adherent EC the biomaterials were cut into circular samples (diameter 6 mm) and fixed in 96-well plates (Nunc®, Wiesbaden, Germany) using steel rings. 96-well plates made of tissue cultured polystyrol (TCPS) (Nunc®, Wiesbaden, Germany) were used as a reference.

Cell separation and expansion

Human saphenous vein EC (HSVEC) were harvested from discarded segments of vena saphena magna of patients (n = 5) undergoing artery bypass surgery. Myofibroblasts (FB) were isolated from aortic segments of explanted hearts after heart transplantation using the same protocol (see below). Informed consent was obtained from each cell donor. The protocol for isolation of EC was approved by the Institutional Review Board of the University of Regensburg. Study and preparation protocol were approved by the local human ethics committee (no. 99/133).

HSVEC and FB were isolated and cultured as previously reported by Lehle et al.¹⁴ Briefly, EC were detached by collagenase treatment (0.05%; Roche, Basel, Switzerland), washed with 10 mM HEPES (Sigma, St. Louis, MS, USA) and cultured in GMS (growth medium with serum). Confluent monolayers were dissociated and transferred to 0.1% gelatine-coated tissue culture flasks (Nunc®). Aortic segments were minced, incubated with collagenase (30 min, 37°C, 5% CO₂) and cultured in GMS. Primary cultures were resuspended in GMS with 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Gibco, Karlsruhe, Germany), stored in liquid nitrogen, and recultured 2 days before the experiments started. EC were characterized by their cobblestone structure monitored by phase contrast microscopy (Leica DMRBE, Bensheim, Germany) and by flow cytometric analysis using anti-human CD31 antibody staining (Ancell, Bayport, MN, USA). FB were characterized by their spindle-shaped morphology and staining with AS02-antibody (Dianova, Hamburg, Germany).

Cell seeding

Recultured EC were detached with collagenase, resuspended in GMS, counted with an automated cell counter (CASY, Schärfe System, Reutlingen, Germany), and seeded at a density of 60.000 cells per cm² (hyperconfluent seeding) and 15.000 cells per cm² (hypoconfluent seeding) in 150 µl GMS for 1 and 5 days, respectively.

For co-culture experiments myofibroblasts were seeded at a density of 60.000 cells per cm². After one day, medium was renewed. Finally, after 3 days 15.000 HSVEC per cm² were seeded on the attached FB and incubated for another 5 days. Medium was exchanged after 1 and 3 days.

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) of the biomaterials was performed before (blank) and after cell seeding. Specimens were extensively washed with PBS, fixed

with paraformaldehyde (4%), dehydrated and dried. After drying, the specimens were mounted on aluminium stubs with carbon disks and colloidal quick drying silver paint (Balzers SCD 040, PROVAC GmbH, Liechtenstein). Then specimens were coated with gold- palladium, by means of a sputter-coater (Balzers SCD 040, PROVAC GmbH, Liechtenstein). Surface topography was visualized by scanning electron microscopy (SEM) using a FEI Quanta 400 (FEI Company Hillsboro Oregon USA). SEM micrographs were used to estimate the cell density of EC cultured on biomaterials and TCPS.

Histological and immunohistochemical analyses

For histological analyses, specimens were fixed in 4% (v/v) buffered formaldehyde and dehydrated with an ascending series of graded ethanol, embedded in paraffin, sectioned at 4 μm , and processed for hematoxylin and eosin (H&E) staining. For immunohistochemical analyses the sections were stained using antibodies against von Willebrand Factor (vWF, Sigma, Saint Louis, USA). Sections were deparaffinised and incubated at room temperature with primary antibodies for 2 h and biotinylated anti-mouse IgG secondary antibody (Dianova, Hamburg, Germany) for 30 min. Staining signals were developed using the streptavidin-biotin universal detection system (Vector Laboratories, Peterborough, England) and DAB (diaminobenzidine) substrate solution (Sigma, Saint Louis, USA).

Adhesion assay of Calcein-loaded PBMC

After giving informed consent blood was drawn by venipuncture from male healthy adult volunteers. Blood was collected into EDTA-monovettes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll density gradient separation (1.073 g/ml; Amersham Biosciences, IL, USA) (900g, 15 min, room temperature) according to Sozzani et al.¹⁵ PBMC were isolated from the buffy coat layer, washed two times in

PBS (300g, 10 min), loaded with calcein-acetomethylester (calcein-AM; stock solution: 1 mg/ml in DMSO; working concentration: 5 µg/ml; Molecular probes, Eugene, OR, USA),¹⁶ and counted using a Neubauer haemocytometer. For the adhesion assay blank tissue samples, endothelialized specimens, and TCPS were incubated with 2×10^5 PBMC per 0.3 cm² culture area (37 °C, 5% CO₂, 30 min). Half of endothelialized samples were additionally incubated with TNF (10 ng/ml; tebu-bio, Offenbach, Germany) for 6 h (= stimulated control cells). After incubation non-adherent PBMC were removed by rinsing three times with PBS. Adherent PBMC were lysed in 1% triton X-100 (Biorad, Hercules, CA, USA) and frozen over night. After thawing lysates were transferred into new 96-well plates. Fluorescence intensity (385 nm/535 nm) was measured using the Wallac 1420 Victor 3TM Plate Reader (PerkinElmer, MA, USA). The amount of adherent PBMC was estimated using a standard curve. Definite amounts of labelled PBMC were correlated with respective fluorescence intensity.

Adhesion assay of labelled platelets

Platelet adhesion was measured according to Stevens.¹⁷ Briefly, blood from our male healthy adult volunteers was collected into monovettes containing sodium citrate as anticoagulant, and was centrifuged (300g, 15 min, 37 °C). Platelet rich plasma was taken from the supernatant, transferred into a polypropylene syringe containing 10% aqueous citrate dextrose (80 mg citrate, 120 mg glucose monohydrate in 10 ml H₂O), and centrifuged again in order to discharge serum. Platelets were stained with calcein-AM (see above), washed in PBS, and resuspended in RPMI 1640 (PANBiotec, Aidenbach, Germany). Platelets (2×10^6 per 0.3 cm² culture area) were incubated with biomaterials (blank and seeded with HSVEC) for 30 min under standard culture conditions. After treatment samples were washed, lysed, and frozen overnight. After

thawing the fluorescence intensity was measured according to the PBMC adhesion assay.

Interleukin-6 secretion

The concentration of interleukin-6 (IL-6) was measured in the supernatants of untreated and TNF-treated HSVEC (6 h) cultured on NR or TCPS using a commercially available ELISA-kit (BeckfieldCoulter, Krefeld, Germany).

Prostacyclin secretion

The concentration of prostacyclin was determined in the supernatants of HSVEC cultured on NR or TCPS. HSVEC were seeded and cultured in GMS as described above. Then medium was exchanged and cells were incubated for 6 h in incubation buffer (5 mM glucose, 0.5 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂ in PBS). Thereafter, 6-keto prostaglandin-F1 α concentration, a first line prostacyclin derivate was analysed using the 6-keto prostaglandin-F1 α EIA kit (Kayman Chemicals, Ann Arbor, USA).

Analysis of proliferation and metabolic status

Proliferation was verified by addition of 0.1 μ Ci ³H-methyl-thymidine per 96-well (Amersham Pharmacia, Bucklinghamshire, England) for 24 h. Subsequently, cells were dissociated with 2.5% trypsin/1% EDTA (Biowhittaker, MD, USA) and harvested on glass filter membranes (Filtermat B, Wallac, Turku, Finland). Incorporated radioactive thymidine per well was measured in corrected counts per minute (ccpm) using a Wallac Microbeta Liquid Luminescence and Scintillation Counter (Perkin Elmer, Boston, USA) according to manufacturer's instructions.

Mitochondrial metabolic activity of cells cultured on TCPS and on decellularized biomaterials was measured in triplicate using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) assay (Promega, WI, USA). Briefly, after cultivation the medium (GMS) was replaced with endothelial growth medium (without

serum) and MTT for 1 h. Subsequently the supernatant was transferred in a new 96-well plate and the absorbance was detected at 490 nm.

Statistics

Data were presented as mean \pm standard deviation (SD), and analysed with Wilcoxon-Signed-Rank-Test (SigmaStat, SPSS Inc., IL, USA). P-values \leq 0.05 were considered significant. All analysis were done with 5 different cultures in triplicate or quadruplicate.

RESULTS

EC seeding on different biomaterials

As shown in Figure 1, pericardium presented as a matrix of collagen fibres. Blank biomaterial revealed completely decellularized. Hyperconfluent seeding of EC on GA cross-linked bovine pericardium (CEPP) resulted in isolated, rounded up EC after 24 h. In contrast, the same seeding procedure on GA cross-linked and detoxified bovine pericardium (below termed as NR) and GA cross-linked porcine mitral valve (CEMP) resulted in a confluent monolayer of EC and spread EC not forming a monolayer, respectively. Due to the acceptable adhesive properties of NR the cellular functions of HSVEC seeded on this material was evaluated with 5 different cultures.

Endothelialized NR and native human mitral valve (Fig. 1F, 2A) showed comparable physiologic surface anatomy (endothelial layer in SEM micrographs). The monolayer configuration of seeded cells as well as their endothelial origin was confirmed by immunohistochemical staining using anti-von-Willebrand-Factor antibody (Fig. 2C).

Proliferation and cytotoxicity

NR prostheses allowed adhesion of HSVEC (Fig. 1F). HSVEC (60.000 per cm²) seeded on NR and TCPS for 24 h showed cell densities of 47.600 ± 3.100 cells per

cm² and 47.300 ± 5300 per cm² (not significant), respectively. However, cell growth failed. Hypokonfluent EC seeding (15.000 HSVEC per cm²) did not result in a monolayer. Figure 2B shows no viable EC on NR after 5 days in culture. Despite an increase in the cultivation time up to 7 days, the incorporation of ³H-methyl-thymidine was significantly reduced in HSVEC cultured on NR (TCPS: 6717 ± 1618 ccpm; NR: 71.3 ± 15.8 ccpm; $p \leq 0.001$).

The MTT cytotoxicity assay showed an impaired metabolic activity of HSVEC directly attached to NR (Fig. 3A). The metabolic activity of HSVEC seeded on TCPS exceeded that of HSVEC on NR by a factor of 2.5 ± 0.4 ($p \leq 0.05$).

Biochemical properties

To evaluate the pro-inflammatory response of EC seeded on NR and TCPS (1) the release of IL-6 and (2) the adhesion of PBMC was determined. Under non-stimulating conditions EC adhered onto NR produced significantly more IL-6 than EC seeded on TCPS (Fig. 3B). Stimulation with TNF resulted in a significant increase in the release of IL-6 into the supernatant (EC on NR: 3.4 ± 0.5 ; EC on TCPS: 10.1 ± 4.1 ; $p \leq 0.001$). However, maximum concentrations were comparable (EC on NR: 191 ± 85 pg/ml; EC on TCPS: 153 ± 84 pg/ml). Similarly the adhesion of PBMC onto non-stimulated EC cultured on NR was higher by a factor of 1.4 ± 0.3 compared to EC cultured on TCPS. Incubation with TNF resulted in an increase of adherent PBMC (Fig. 3D), but there was no difference between both materials. Finally, blank NR prevented PBMC adhesion, whereas the adhesion was aggravated on TCPS.

To demonstrate the anti-thrombotic properties of HSVEC attached to NR, (1) the release of prostacyclin and (2) the adhesion of platelets was analyzed. EC seeded onto NR and TCPS produced 2636 ± 863 pg/ml and 2714 ± 283 pg/ml prostacyclin (not significant), respectively. Furthermore, the adhesion of platelets onto HSVEC

was also independent of the type of culture surface (Fig. 3 C). The amount of adherent platelets was reduced by a factor of 2.0 ± 0.5 and 3.8 ± 1.0 for NR and TCPS (Fig. 3C). Endothelialization reduced the adhesion of platelets.

Co-cultivation with fibroblasts

To evaluate the impact of fibroblast pre-seeding on EC growth and function a two-stage seeding protocol was introduced (see above). The incorporation of ^3H -thymidine was used to verify the proliferative activity of the cells. Seeding of fibroblasts or EC onto NR resulted in a minimal incorporation rate of radioactive labelled thymidine. However, pre-seeding with fibroblasts accompanied by a hypoconfluent seeding of HSVEC ($15.000 \text{ cells per cm}^2$) increased the incorporation rate of ^3H -thymidine by a factor of 10.1 ± 4.3 . As shown in Figure 4 A, already 2 days after seeding the proliferation activity reached maximum values. On day 5 the amount of proliferating cells was significantly reduced. The same could be observed for EC cultured on TCPS after reaching confluence (data not shown).

Fibroblast pre-seeding did not affect the pro-inflammatory response of co-cultured EC. The introduction of a fibroblast interlayer did not stimulate the attached EC. As shown in Figure 4B, the amount of adherent PBMC was comparable. In addition, stimulation with TNF significantly increased the amount of adherent PBMC. Furthermore, recellularization resulted in a decreased attraction of PBMC onto biomaterial (EC on NR 16.084 ± 1.432 adherent PBMC; blank NR 26.386 ± 3.524 adherent PBMC; $p \leq 0.05$).

In addition, the anti-thrombotic effect of co-cultured EC was also documented. The amount of adherent platelets was identical under both culture conditions (EC on NR: $(5.8 \pm 1.0) \times 10^5$ adherent platelets; FB + EC on NR: $(6.1 \pm 1.3) \times 10^5$ adherent

platelets). However, co-cultured EC produced by a factor of 4.2 ± 2.3 significantly ($p \leq 0.05$) more prostacyclin than directly seeded EC (Fig. 4 C).

DISCUSSION

Seeding of human EC on the luminal surface of cardiovascular prostheses is expected to be necessary to improve biocompatibility and hemocompatibility of biomaterial surfaces.¹⁸ In the present study different xenogenic and GA-cross-linked materials – already of great clinical interest – were subjected to cell seeding using patient-derived vascular EC. With our in vitro model we could show (1) the poor EC attachment onto GA-fixed valves, and (2) the reduced adhesion of inflammatory cells and platelets onto endothelialized biomaterials. Furthermore, our two-stage seeding protocol enables improved reendothelialization of biomaterials with unchanged anti-inflammatory and anti-thrombogenic properties.

Cell seeding on GA-fixed valves has yielded poor results, mainly due to continual release of toxic glutaraldehyde and remaining free aldehyde groups.¹⁹ Our data clearly approved the reduced attachment and the missing proliferation of EC seeded on GA cross-linked materials. After extensively rinsing of the valves, EC indeed attached on the surface of the xenogenic biomaterial, but the cells did not survive 5 days.²⁰ They rounded up and lost adhesion within 2 days.¹³ Implantation in a primate model resulted in complete loss of the cell layer.²¹ Gulbins et al.¹³ postulated that cross-links of collagen fibers result in a hydrophobic surface, thus reducing the capability of cells to adhere. The adhesion of fibroblasts was better than that of EC, although fibroblasts did not reach confluence either. Fibroblasts obviously had a better ability to adhere on different surfaces than did EC. Additionally, their potential to build intercellular matrix proteins further improved their adhesion.

Apart from a complete endothelialization of biomaterial surfaces, functional integrity of seeded cells is mandatory in order to contribute favourably to the performance of cardiovascular prostheses.²² Activated EC can exert pro-inflammatory and pro-thrombotic properties and may have negative impact on haemocompatibility of cardiovascular prosthesis.^{23,24} Kasimir et al.²⁵ documented that decellularized porcine matrix acts as a platelet-activating surface. Seeding with EC effectively abolishes the platelet adhesion and activation and therefore is necessary to eliminate thrombogenicity in tissue engineered heart valves.²⁵ Recently Levi et al.²⁶ suggested that early platelet adhesion is an important player in long-term failure of xenogenic cardiovascular implants. Our data clearly show that endothelialisation significantly reduced platelet adhesion. The introduction of a two-step seeding protocol of myofibroblasts and EC resulted in an increased secretion of prostacyclin. We hypothesize that an increase in prostacyclin secretion might improve the anti-thrombotic features of endothelialized biomaterial. In addition, an inflammatory reaction to heart valve prostheses is thought to contribute to long-term failure of these implants.²⁷ On the other hand, intact immunogenic response is desirable as it might reduce prosthesis infection. In the present study, we demonstrated that EC seeded on NR showed maximum inflammatory responses comparable to cells on TCPS. Co-cultivation with fibroblasts improved the inflammatory reaction without affecting the basal response. These data indicate that endothelialization makes biological implants accessible to a regulated immunogenic reaction. In addition, attachment of EC on NR material reduced the amount of adherent inflammatory cells compared to blank biomaterial. A reduction of immigrating inflammatory cells might also influence the degeneration of biomaterials (neointima and pannus formation), the formation of a foreign body reaction and the structural deterioration.²⁸

CONCLUSIONS

We could show that biological heart valve materials differ importantly in their potential to adhere human endothelial cells. Furthermore, directly endothelialized valves presented impaired functional properties: (1) Lacking regenerative potential and (2) increased inflammatory status. However, preseeding with human vascular myofibroblasts using a two-step seeding protocol induces proliferation without a negative impact on inflammatory or thrombotic state of seeded cells. Recellularized biomaterials did attract less platelets and inflammatory cells independent of seeding model, thus indicating favourable properties in order to improve biomaterial performance. Future studies will focus on the impact of the two-step seeding model on cell retention and functional properties under flow conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the excellent technical assistance of S. Bergman, C. Leykauf, and K. Bielenberg. All experiments comply with the current national laws and the preparation protocol was approved by the local human ethics committee (No 99/133).

REFERENCES

- [1] Yacoub MH, Takkenberg. JJ. Will heart valve tissue engineering change the world. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005; 2(2): 60-1.
- [2] Emery RW, Krogh CC, Arom KV, Emery AM, Benyo-Albrecht K, Joyce LD, et al. The St. Jude Medical cardiac valve prosthesis: a 25-year experience with single valve replacement. *Ann Thorac Surg* 2005; 79(3):776-82.

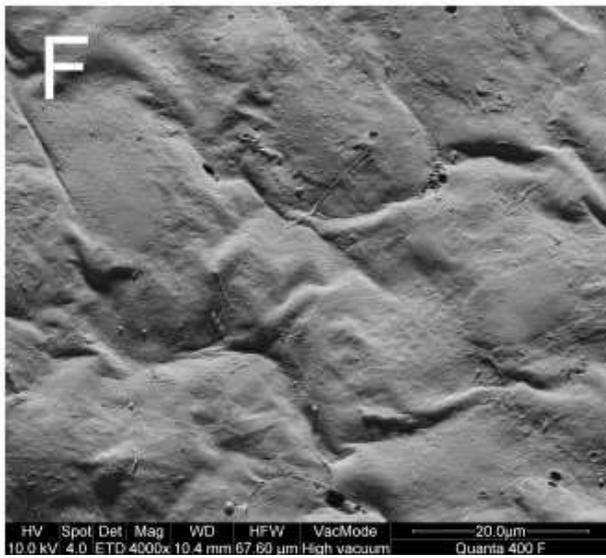
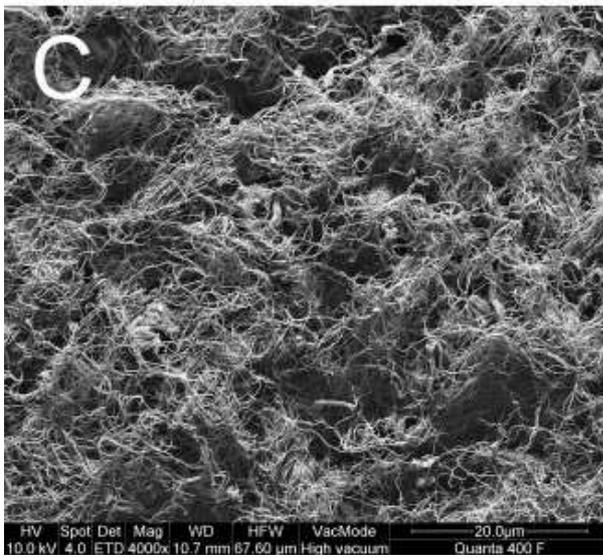
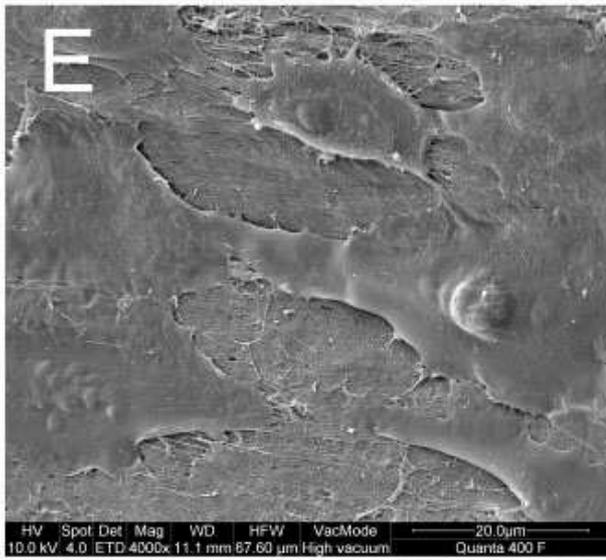
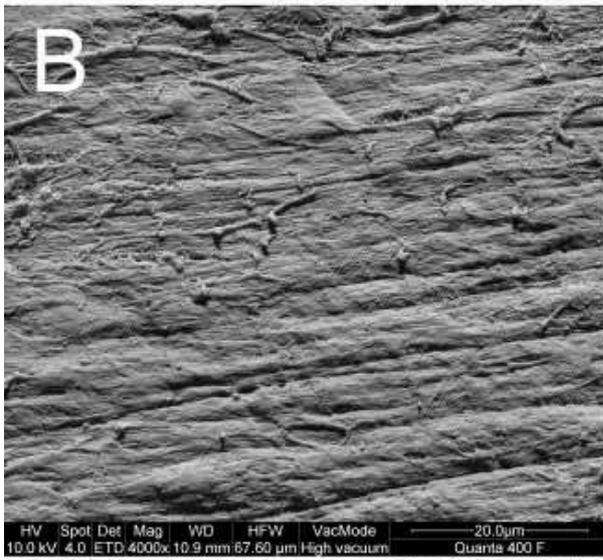
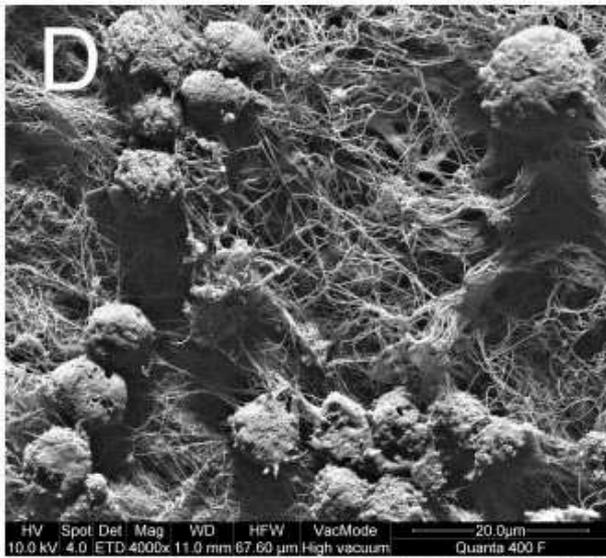
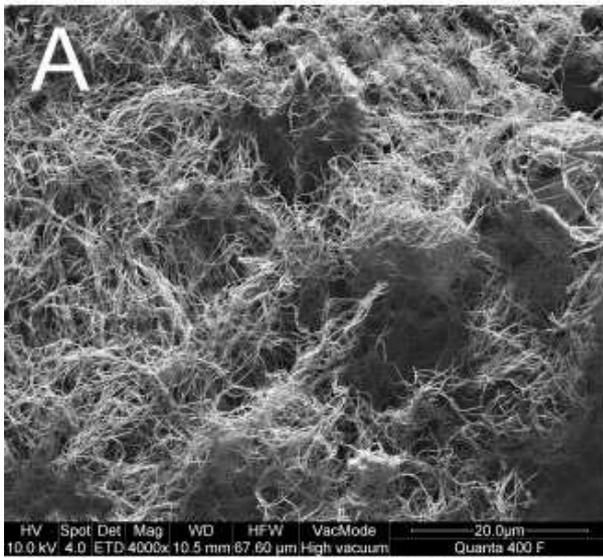
- [3] Cannegieter SC, Rosendaal FR., Briet E. Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses. *Circulation* 1994; 89(2): 635-41.
- [4] Schoen FJ, Levy RJ. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res.* 1999; 47(4): 439-65.
- [5] Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U et al. Early failure of tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; 23(6): 1002-6.
- [6] Yacoub M, Rasmi NR, Sundt TM, Lund O, Boyland E, Radley-Smith R et al. Fourteen-year experience with homovital homografts for aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110(1): 186-93.
- [7] Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin D, Moran A et al. Early in vivo experience with tissue engineered trileaflet heart valves. *Circulation* 2000; 102: III22–29.
- [8] Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg* 2005; 79: 1072-80.
- [9] Trantina-Yates AE, Human P, Bracher M, Zilla P. Mitigation of bioprosthetic heart valve degeneration through biocompatibility: in vitro versus spontaneous endothelization. *Biomaterials* 2001; 22(13):1837-46.
- [10] Hoffman D, Gong G, Liao K, Macaluso F, Nikolic SD, Frater RW. Spontaneous host endothelial growth on bioprosthesis. Influence of fixation. *Circulation* 1992; 86 (5 Suppl): II 75-9.
- [11] Bengtsson L, Ragnarson B, Haegerstrand A. Lining of viable and nonviable allogeneic and xenogeneic cardiovascular tissue with cultured adult human venous endothelium. *J Thorac Surg.* 1993; 106(3): 434-43.

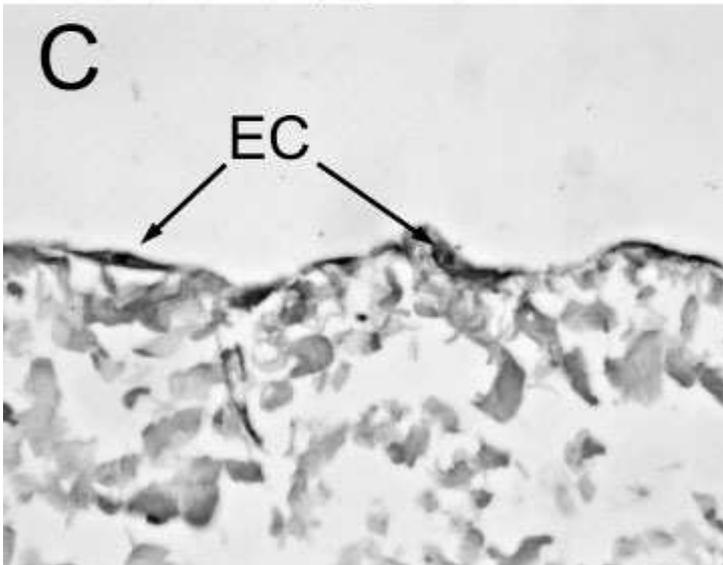
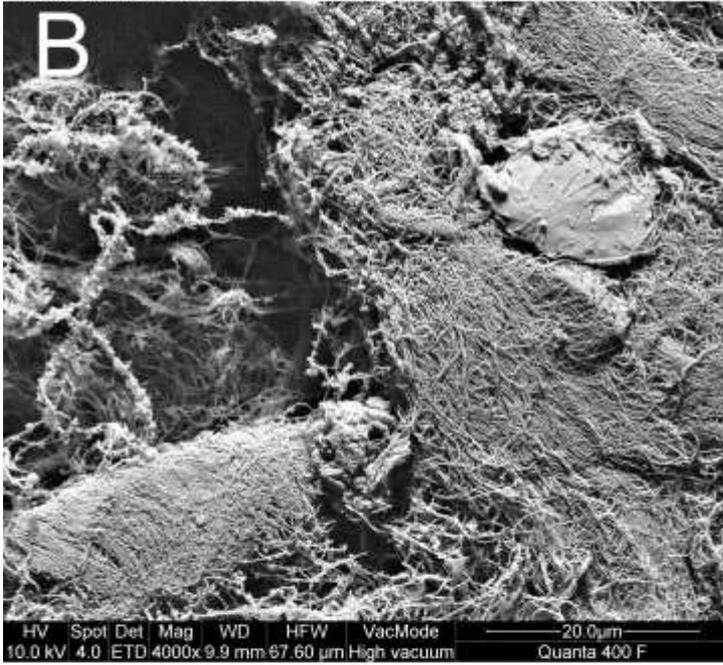
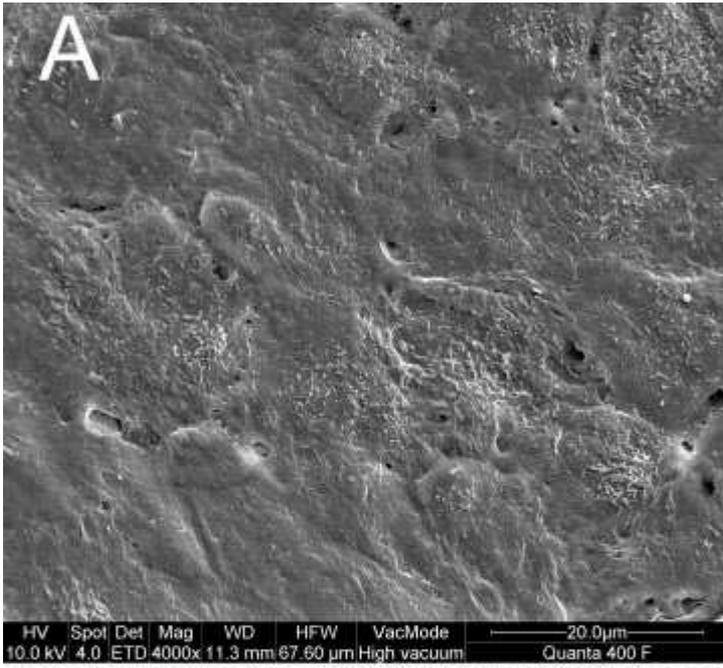
- [12] Fischlein T, Fasol R. In vitro endothelization of prosthetic heart valves. *J Heart Valve Dis.* 1996; 5(1): 58-65.
- [13] Gulbins H, Goldemund A, Anderson I, Haas U, Uhlig A, Reichart B, et al. Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 125(3): 592-601.
- [14] Lehle K, Haubner F, Munzel D, Birnbaum DE, Preuner JG Development of a disease-specific model to evaluate endothelial dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 357(1):308-13.
- [15] Stevens J. M. Platelet Adhesion performed under static conditions. *Methods Mol Biol* 2004; 272: 145-51.
- [16] DeClerk L, Mertens A, Moens M, Stevens W. Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *J Immunol Meth* 1994; 172:115-24.
- [17] Sozzani S, Vecchi A, Allavena P, Maucovani A. Chemotaxis and interaction with vascular or lymphatic endothelium. *Methods Mol Biol* 2004; 239: 1-16.
- [18] Gulbins H, Pritisanac A, Uhlig A, Goldemund A, Daebritz S, et al. Seeding of human endothelial cells on valve containing aortic mini roots: development of a seeding device and procedure. *Ann Thorac Surg* 2005; 79(6): 2119-26.
- [19] Grabenwoger M, Sider J, Fitzal F, Zelenka C, Winberger U, Wolner E et al. Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. *Ann Thorac Surg.* 1996; 62(3): 772-7.
- [20] Fischlein T, Zilla P, Meinhart J, Deutsch M. Clinical lining of prosthetic femoropopliteal bypass grafts with cultured autologous endothelial cells. *Transplant Proc.* 1992; 24(6): 3043.

- [21] Lehner G, Fischlein T, Barretton G, Murphy JG, Reichhart B. Endothelialized biological heart valve prostheses in the non-human primate model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1997; 11(3): 498-504.
- [22] Remy-Zolghadri M, Laganriere J, Oligny JF, Germain L, Auger FA. Endothelium properties of a tissue engineered blood vessel for small-diameter vascular reconstruction. *J Vasc Surg.* 2004; 39(3): 613-20.
- [23] Prasad Chennazhy K, Krishnan LK. Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26(28): 5658-67.
- [24] McGuigan A, Sefton M. The Influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. *Biomaterials* 2007; 28: 2547-71.
- [25] Kasimir MT, Weigel G, Sharma J, Rieder E, Seebacher G, Wolner E et al. The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation. *Thromb Haemost* 2005; 94 (3): 562-7.
- [26] Levi M, van der Poll T, Buller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 2004; 109(22): 2698-704.
- [27] Fann JI, Miller DC, Moore KA, Mitchell RS, Over PE, Stinson EB, et al. Twenty year experience with porcine bioprotheses. *Ann Thorac Surg* 1996; 62(5): 1301-11.
- [28] Human P, Zilla P. Characterization of the immune response to valve bioprotheses and its role in primary tissue failure. *Ann Thorac Surg.* 2001; 71(5 Suppl): 385-8.

blank

recellularized





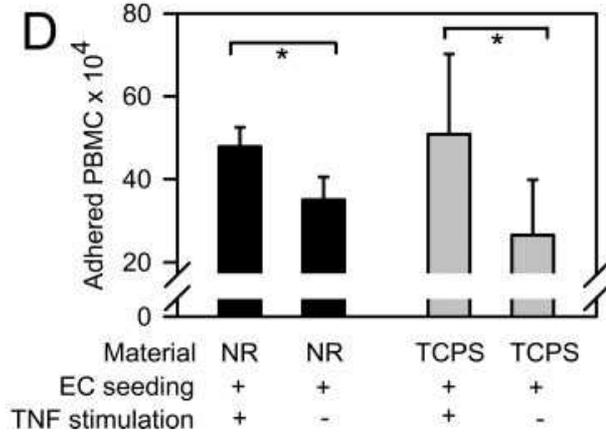
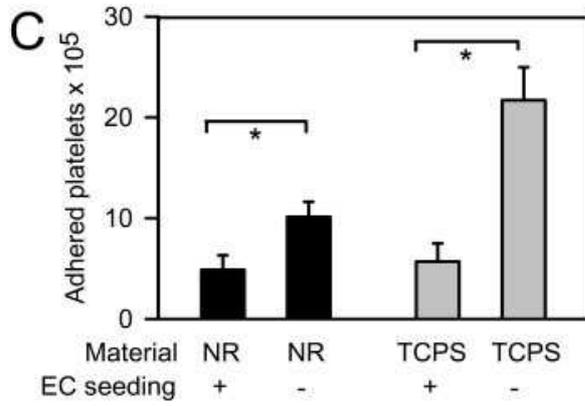
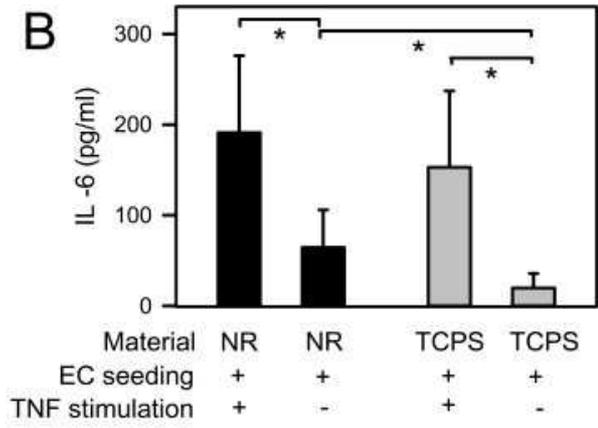
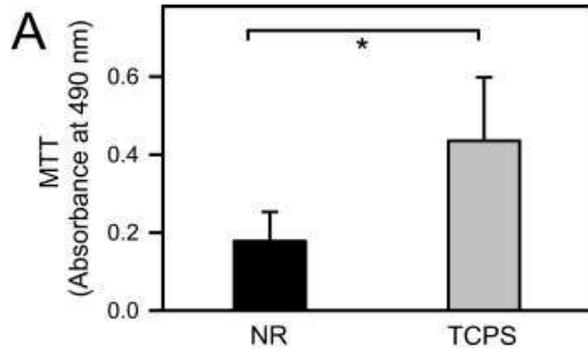


FIGURE LEGENDS:

Figure 1.

Scanning electron microscopy image of glutaraldehyde (GA) crosslinked bovine pericardium (A,D), GA crosslinked porcine mitral valve (B,E), and GA crosslinked, detoxified bovine pericardium (C,F) in its blank (A,B,C) and endothelialized (D,E,F) forms (magnification, 4000x).

Figure 2.

Scanning electron microscopy image of a human mitral valve (A) and GA crosslinked, detoxified bovine pericardium after hypokonfluent seeding and 5 days in culture (B). Immunohistochemical staining of von Willebrand-factor staining of EC seeded on GA crosslinked, detoxified bovine pericardium (C).

Figure 3.

Metabolic activity of endothelial cells (EC) on GA crosslinked, detoxified bovine pericardium (NoReact®, NR) and tissue-cultured polystyrol (TCPS) (A), stimulated and basal IL6-secretion of EC on NR and TCPS (B), adhesion of platelets to blank and endothelialized NR and TCPS (C), stimulated and basal adhesion of PBMC to EC on NR and TCPS (D). $p \leq 0.05$.

Figure 4 .

Incorporation of ^3H -thymidine into endothelial cells (EC) seeded on GA crosslinked, detoxified bovine pericardium (NoReact®, NR) after fibroblast (FB) pre seeding (black bars, NR/FB/EC), into directly seeded FB (gray bars, FB) and into directly seeded EC (dark gray plots, EC) on NR (A). Adherence of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) onto endothelialized NR with and without FB pre seeding under stimulating (TNF, 6 h) and non-stimulating conditions. (C) Secretion of prostacyclin of EC seeded on NR with and without FB pre seeding. $p \leq 0.05$.

11. Danksagung

Die Versuche zur vorliegenden Doktorarbeit wurden im Labor der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahen Gefäßchirurgie der Universität Regensburg durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. K. Lehle unter deren Betreuung ich meine Dissertation anfertigen durfte. Sie war jederzeit bereit die Versuchsdurchführung mit guten Ideen und großen Engagement zu begleiten und trug so maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. C. Schmid für die wertvollen Anregungen beim Erstellen der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Sara Bergmann, Katrin Bielenberg und Christina Leykauf bedanken, die mir die Durchführung der Versuche mit ihrer kompetenten Hilfe erheblich erleichtert haben.

14. Curriculum Vitae

Simon Benjamin Schopka
Geboren am 04.12.1977 in Regensburg

Schulausbildung

1984–1988 Grundschule in Regensburg
1988 – 1998 Albrecht-Altendorfer-Gymnasium Regensburg

Wehrdienst

1998–1999 Luftlande- Lufttransport Schule der Bundeswehr in Altenstadt

Studium

2001–2007 Studium der Medizin an der Universität Regensburg

Wissenschaft

2004–2008 Dissertation mit dem Thema „ In vitro Haemokompatibilitätstestung kardiovaskulärer Biomaterialien“ an der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie der Universität Regensburg

2005 Vorstellung der Arbeit 4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society in München

2006 Vorstellung der Arbeit 2nd International Conference Strategies in Tissue Engineering in Würzburg

2008 Publikation “Recellularization of biological heart valves with human vascular cells: In vitro hemocompatibility assessment” Journal of Biomedical Biomaterial Research Part B: Applied Biomaterials

Berufliche Tätigkeit

Seit 01/2008 Assistenzarzt an der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie der Universität Regensburg