

Gewinnung funktionsfähiger Endothelzellen aus Venen

A. Huber, U. Bay, W. Müller-Glauser*, M.-C. Hensel*, K. Lehmann*, M. Turina*

Gebrüder Sulzer AG, Medizinaltechnik, Winterthur
*Klinik für Herzgefäßchirurgie, Universitätsspital Zürich,

EINLEITUNG

Die Grenze zwischen Blut und Gefäßwand wird vom Endothel gebildet. Dieses Gewebe, das aus nur einer Schicht von Zellen, den Endothelzellen, besteht, kleidet die Blutgefäße lückenlos aus. Durch ihre Aktivität verhindern die Endothelzellen, dass das Blut gerinnt. Dagegen verschliessen Blutgerinnsel Prothesen aus alloplastischen Materialien in hohem Prozentsatz, wenn der Innendurchmesser weniger als 6 bis 8 mm beträgt. Deshalb ist der Ersatz kleiner Arterien bei fehlenden oder unbrauchbaren Venen noch immer ein ungelöstes Problem der Chirurgie.

Um bei kleinlumigen Gefäßprothesen eine antithrombogene Oberfläche zu erhalten, wird versucht, sie mit autologen, d.h. patienteneigenen Endothelzellen zu versehen (1,2,5). Dafür werden reine Populationen funktionsfähiger Endothelzellen benötigt.

Ziel dieser Untersuchung war es, ein Routineverfahren zur enzymatischen Isolation von reinen Populationen venöser Endothelzellen zu entwickeln, und die notwendigen Apparate für eine automatisierte Durchführung zu bauen.

METHODE

Entnahme und Lagerung der Vene

Alle Präparationsschritte erfolgen unter streng aseptischen Bedingungen mit sterilen Instrumenten. Ein Venenstück wird nach chirurgischen Standardmethoden entnommen, mit Kulturmedium (6) gespült und beidseitig kanüliert. Es wird im Venenhalter (7) montiert (Abb. 1), so dass es etwa 80 % seiner in situ Länge hat (4). Dann wird der Halter durch einen Glaszylinder gasdicht geschlossen und der Raum zwischen Zylinder und Vene mit physiologischer Salzlösung gefüllt. Das Lumen der Vene wird mit Kulturmedium ausgespült und anschliessend für Transport und Lagerung mit frischem Kulturmedium gefüllt.

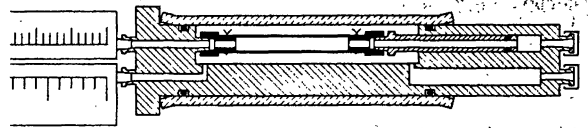


Abb. 1: Venenhalter. Beidseitig kanülierte Vene im Halter montiert; auf der linken Seite Spritzen zum Spülen und Füllen

Gewinnung der Endothelzellen

Die Endothelzellen werden mit dem Venenhalter in einem neuentwickelten Apparat (Abb. 2) automatisch isoliert. Dem Verfahren liegt eine enzymatische Ablösung der Zellen von der Gefäßwand zugrunde. Während des ganzen Vorgangs wird darauf geachtet, dass die Vene nie kollabiert oder überdehnt wird. Im folgenden werden die einzelnen Phasen der Zellgewinnung kurz beschrieben (Abb. 3).

1. Das Kulturmedium wird mit physiologischer Pufferlösung (3) ausgespült.
2. Die Vene wird mit Enzymlösung von 37°C gefüllt (3).
3. Die innere Oberfläche der Vene bleibt bei 37°C während der Inkubationszeit mit der Enzymlösung in Kontakt.
4. Dabei wird die Enzymlösung in regelmäßigen Abständen gegen frische ausgetauscht.
5. Die Vene wird mit Pufferlösung (3) von 4°C sanft gespült.
6. Die Vene wird kräftig gespült. Die Zellen werden im Zellabscheidefilter zurückgehalten, während die Enzymlösung mit der Spüllösung durch das Filter abfließt.
7. Die gespülten Zellen werden durch eine kräftige Strömung mit Kulturmedium von 4°C in den Vermehrungsreaktor zur Anzucht transferiert.

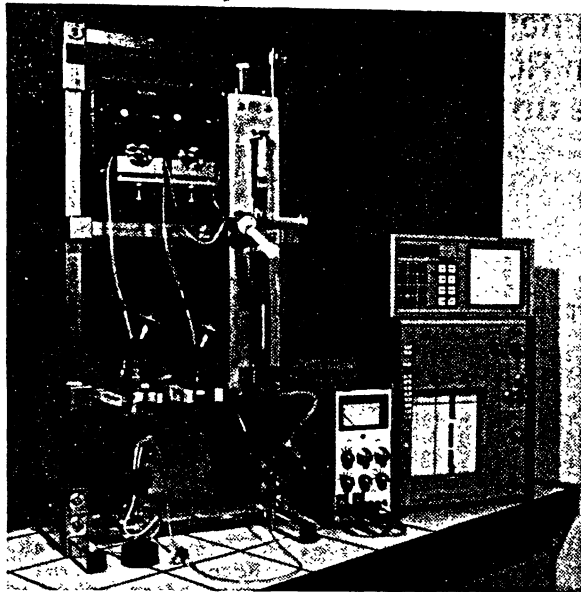


Abb. 2: Automatischer Apparat mit eingesetztem Venenhalter

RESULTATE

Die Druck- und Flusswerte, die in der Vene während der Zellgewinnung auftreten, sind in ihrem zeitlichen Verlauf in Abbildung 3 dargestellt. Die Inkubationsphase ist in dieser Darstellung zeitlich stärker gefasst als die übrigen Phasen. Der Druck war nur beim kräftigen Ausspülen der Zellen (Phase 6) kurzzeitig leicht hyperten (140 mmHg), d.h. etwas höher als der normale arterielle systolische Blutdruck.

Die Anfärbung (Trypanblau) der Veneninnenseite nach der Isolation zeigte, dass regelmässig über 95 % der Endothelzellen von der Venenwand abgelöst worden waren. Diese Beobachtung wurde durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt.

Die Reinheit der Endothelzellpopulationen wurde an Kulturen durch spezifische Markierung der Zellen für das Faktor VIII-related Antigen (3) und durch DilAcLDL-Aufnahme (8) nachgewiesen.

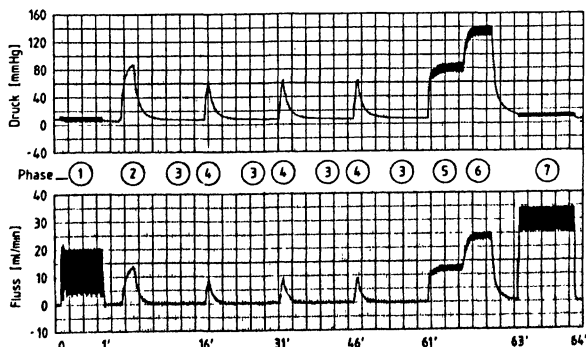


Abb. 3: Druck- und Flussverlauf bei einer automatischen Isolation von Endothelzellen aus einer Vene mit 4 mm Innendurchmesser

Die Funktionsfähigkeit der Endothelzellen wurde durch Implantation beschichteter Prothesen in den arteriellen Kreislauf von Hunden gezeigt (5) und auch durch Messung der Prostacyclinproduktion nachgewiesen (5).

DISKUSSION

Mit den beiden neuen Geräten, dem Venenhalter und der Automatik dazu, die hier beschrieben werden, können reine Populationen von Endothelzellen aus Venen routinemässig gewonnen werden.

Der Venenhalter schützt die Vene während Transport und Lagerung vor Austrocknung und mikrobieller Kontamination. Auch bei der Isolation ermöglicht er eine schonende und definierte Halterung der Vene. Das verhindert Verletzungen der Endothelzellschicht. Es werden darum keine anderen Zelltypen als Endothelzellen isoliert, so dass man Zellpopulationen erhält, deren Reinheit den Anforderungen für die Prothesenbeschichtung genügt.

Für die Durchführung von grösseren Versuchsserien und vor allem für den späteren klinischen Einsatz ist eine Automatisierung der Endothelzellgewinnung unumgänglich. Für diese Anwendungen wurde die Automatik gebaut.

Das neue, automatische Verfahren realisiert sowohl die Qualitätsanforderungen bezüglich Reinheit der Endothelzellpopulationen als auch die Forderung nach effizienter Durchführung der Zellgewinnung im Routineeinsatz.

LITERATUR

- (1) Herring M, Gardner A, Glover J: A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery* 84: 498-504, 1978.
- (2) Herring MB, Compton RS, LeGrand DR, Gardner AL, Madison DL, Glover JL: Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene popliteal bypasses. *J Vasc Surg* 6: 114-118, 1987.
- (3) Jaffe EA: Culture of human endothelial cells. *Transplant Proc* 12 No.3, Suppl. 1: 49-53, 1980.
- (4) Lehmann KH, Müller-Gläuser W, Bay U, Turina M: Harvesting of highly purified canine venous endothelial cells for lining of small diameter vascular prostheses. *Eur Surg Res* 20 Suppl 1: 1, 1988.
- (5) Müller-Gläuser W, Lehmann KH, Bittmann P, Bay U, Dittes P, von Segesser L, Turina M: Compliant small-diameter vascular prosthesis lined with functional venous endothelial cells. *Trans Am Soc Artif Int Organs* (in press)
- (6) Thornton SC, Mueller SN, Levine EM: Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* 222: 623-625 (1983).
- (7) Venenhalter (Patent angemeldet)
- (8) Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR: Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99: 2034-2040, 1984.