

**Tissue Engineering von klappentragenden Venensegmenten im allogenen  
Schafmodell – *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen**

Dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation

von  
Dipl. Biol. Carmen Katharina Kleczka  
geboren am 23.04.1974 in Hannover

---

Referent: Prof. Dr. Haverich  
Korreferent: Prof. Dr. Bicker  
Tag der Promotion: 10.07.2002  
Datum der Veröffentlichung: Juli 2002

---

**ZUSAMMENFASSUNG**

Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Arbeitsfeld mit dem Ziel, die Funktionen von Zellen zu untersuchen und darauf basierend bioartifizielle Gewebe oder Organersatzsystemen zu entwickeln. Diese bioartifiziellen Gewebe sollen eingeschränkte Organfunktionen unterstützen oder zum kompletten Ersatz funktionsunfähiger Organe verwendet werden.

Ca. 3 % der Erwachsenen in Europa und Nordamerika leiden an chronisch venöser Insuffizienz (CVI) als Folge einer oder mehrerer Thrombosen in den tiefen Beinvenen, verbunden mit der Zerstörung der Klappensegel. Derzeit gibt es außer patienteneigenen oder allogenen Transplantaten, die nur limitiert vorhanden sind, keinen geeigneten Ersatz. Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Generierung patienteneigener (autologer) klappentragender Venensegmente basierend auf einer azellulären biologischen Startermatrix mit autologen vaskulären Zellen. Für dieses Ziel wurde ein allogenes Modell im Schaf etabliert. Nach Standardisierung einer geeigneten Dezellularisierungsmethode wurden ovine azelluläre Jugularvenensegmente mit Endothelzellen und Myofibroblasten des Empfängerschafes gewebetypspezifisch in einer dreidimensionalen Kultur rebesiedelt. Nach 6 wöchiger Kultivierungs- und Rebesiedlungszeit konnten klappentragende Venensegmente erfolgreich rebesiedelt werden. Dies wurde sowohl durch Übersichtsfärbungen als auch durch immunhistochemische Charakterisierungen mittels Antikörper belegt. Im allogenen Großtiermodell (Schaf) wurden die *in vitro* hergestellten Gefäße zur Überprüfung der immunologischen Kompatibilität und Funktionalität für 1 und 6 Wochen *in vivo* getestet. Aufgrund beschriebener *in vivo* Experimente mit azellulären Herzklappen im ovinen System (O'Brien et al., 1999) wurden in der vorliegenden Arbeit auch azelluläre Venenklappensegmente für 1 und 6 Wochen implantiert. Nach Explantation zeigten diese starke thrombotische Auflagerungen auf den luminalen Wand- und Segelbereichen, sowie Kalzifizierungserscheinungen und Leukozytenimmigration. Es konnte auch schon nach 1 Woche Implantation ein *in vivo*-Rebesiedlung beobachtet werden, wobei sich die interstitiellen Zellen jedoch nicht physiologisch in der Venenwand ausrichteten. Die Klappen der Venen waren insuffizient. *In vitro* rebesiedelte Implantate blieben nach 1 Woche suffizient, zeigte jedoch leichte thrombotische Auflagerungen an den Kommissuren und im Sinus des Segelbereiches. Diese führten nach 6 Wochen zur Bildung einer Neo-Intima in den Segelbereichen, was zu einer Insuffizienz der Klappen führte, während luminale Wandbereiche weitgehend frei waren von solchen Bildungen. Kalzifizierungen oder Leukozytenimmigrationen konnten in den rebesiedelten Implantaten nicht nachgewiesen werden. Kann in weiterführenden Experimenten die Thrombosierung an den kritischen Bereichen der Venenklappe verhindert werden, bietet dieses Modell eine Basis für den xenogenen Einsatz von *in vitro* hergestellten Venenklappen zur Therapie von Patienten mit CVI.

Schlagerworte: Venenklappenersatz, Tissue Engineering, Dezellularisierung

---

## SUMMARY

Tissue engineering is an interdisciplinary field with the aim of research of cell functions and the development of bioartificial tissues or organs. This bioartificial tissues should be able to support organs with limited functions or even replace a whole insufficient organ.

Approximately 3 % of the adult Europeans or north-Americans are suffering from chronic venous insufficiency (CVI) after a thrombosis in the veins of the upper limbs due to destructed vein valves. Except for allogeneous or autologous transplants with limited availability there is currently no suitable replacement for vein valves. The present doctoral thesis focuses on the *in vitro* development of autologous vein valve conduits based on a biologic donor scaffold reseeded with recipients vascular cells. For the practical realisation and further functional examination an allogeneous sheep model was established. After standardisation of a suitable method for cell removal acellular ovine jugular veins were reseeded with endothelial cells and myofibroblasts in a three-dimensional and tissue specific manner. After six weeks of acellularisation, repopulation and incubation *in vitro* vein valved conduits could be reseeded successfully. For validation the segments were characterised by histological and immunohistological analyses. The tissue engineered vein valves were implanted for one and six weeks in an allogeneous sheep model to evaluate graft function and immunologic compatibility. Because of prior descriptions of *in vivo* experiments with acellular heart valves in an ovine model (O'Brien et al., 1999) acellular vein valved conduits were also implanted for one and six weeks in the present study. After explantation this acellular implanted specimens showed thrombus formation on wall and leaflets of the graft as well as calcification occurrence and immigration of leucocytes. After one week *in vivo* the acellular implants were reseeded whereas the interstitial cells showed an unphysiological orientation. The vein valve function of the implanted segments was insufficient. In contrast, *in vitro* reseeded implants were still sufficient after one week. However, at areas where the leaflets attached to the vein wall small thrombi could be detected. Six weeks after implantation, all valves were insufficient due to intimal hyperplasia at the sites of leaflet attachment. Regions beyond the leaflets remained free of such formations *in vivo*. Calcification or immigration of leucocytes could not be observed.

If thrombus formation in critical areas of the vein valve can be avoided in continuative experiments this model will provide a basis for the xenogenic application of *in vitro* developed vein valved conduits for patients suffering from CVI.

key words: vein valve replacement, tissue engineering, acellularisation

---

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1.	Zur Geschichte der Venenklappen	1
1.2.	Aufbau der Vene und der Venenklappen	2
1.3.	Das venöse Rückflusssystem	3
1.3.1.	Oberflächliches Venensystem	4
1.3.2.	Tiefes Venensystem	4
1.3.3.	Perforansvenen	4
1.3.4.	Mechanismen zum Rücktransport des venösen Blutes zum Herzen	4
1.3.4.1.	Passiver Transportmechanismus	5
1.3.4.2.	Aktive Transportmechanismen	5
1.3.4.3.	Muskelpumpe	5
1.4.	Chronisch venöse Insuffizienz	6
1.4.1.	Epidemiologie und soziale Auswirkungen	7
1.4.2.	Wiederherstellung der Venenklappenfunktion	7
1.5.	Tissue Engineering	8
1.5.1.	Tissue Engineering von Blutgefäßen	9
1.6.	Bindegewebe	11
1.6.1.	Bindegewebszellen	11
1.6.2.	Extrazelluläre Matrix	12
1.6.3.	Grundsubstanz der extrazellulären Matrix	12
1.6.3.1.	Proteoglykane	12
1.6.3.2.	Glykoproteine	13
1.6.4.	Kollagenfasern	13
1.6.4.1.	Kollagenbiosynthese	14
1.6.5.	Elastische Fasern	15
1.7.	Ziel der vorliegenden Arbeit	15
1.8.	Versuchsaufbau	16
<b>2.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>18</b>
2.1.	Tiere	18
2.2.	Chemikalien	18
2.3.	Zellkulturmedien und Zusätze	20
2.3.1.	Puffer und Lösungen	21
2.4.	Antikörper und Seren	22
2.5.	Verbrauchsmaterialien	22
2.6.	Geräte	23
<b>3.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>26</b>
3.1.	Identifikation einer Venenklappe	26
3.2.	Dezellarisierungsprozess	26
3.2.1.	Dezellarisierung mit Trypsin/ EDTA	27
3.2.2.	Dezellarisierung mit zwei unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen (A + B Methode)	28
3.2.3.	Dezellarisierung mit Aqua dest.	29
3.2.4.	Dezellarisierung nach Meezan	29
3.2.5.	Dezellarisierung modifiziert nach Meezan mit Natriumdesoxycholat	30

---

3.3.	Nachweis der Dezellularisierung	30
3.3.1.	Beschichten von Objektträgern mit 3-Aminopropyltriethoxy-silan (Silan)	30
3.3.2.	Anfertigen von Gefrierschnitten	31
3.3.3.	Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbung (H&E-Färbung)	31
3.3.4.	Bestimmung des DNS- Gehaltes	32
3.3.5.	Gelelektrophorese der isolierten DNS	33
3.4.	Isolation, Vermehrung und Kultur autologer primärer vaskulärer Zellen	33
3.4.1.	Beschichtung von Zellkulturflaschen mit Gelatine	33
3.4.1.2.	Isolation primärer Endothelzellen	34
3.4.1.3.	Kultivierung von Endothelzellen	34
3.4.2.	Isolation glatter Muskelzellen und Fibroblasten durch Auswachsen	35
3.4.2.1.	Kultivierung von Myofibroblasten (MFb)	35
3.4.3.	Lichtmikroskopische Bestimmung der Zellzahl	35
3.4.4.	Ablösen von Zellen mit Trypsin/ EDTA	36
3.4.5.	Charakterisierung der Zellen	36
3.4.6.	Anfertigen von Zytospots	36
3.5.	Rebesiedlung	37
3.5.1.	Optimierung der Zellzahl	37
3.5.1.1.	Zweidimensionale Besiedlung in einer Kulturplatte mit 24 Vertiefungen	37
3.5.2.	Dreidimensionale Besiedlung im Bioreaktor	38
3.5.2.1.	Der Bioreaktor	38
3.5.2.2.	Einspannen azellulärer Venensegmente in einen Bioreaktor	38
3.5.2.3.	Anschluß der Perfusionsflaschen	39
3.5.3.	Rebesiedlung im Bioreaktor	39
3.5.3.1.	Besiedlung mit Myofibroblasten	40
3.5.3.2.	Besiedlung mit Endothelzellen	40
3.6.	Charakterisierung der rebesiedelten Segmente	41
3.6.1.	Immunhistochemische Auswertung	41
3.6.1.1.	Gegenfärbung	44
3.6.2.	Markierung von Endothelzellen mit <i>Ulex europaeus</i> Lektin	44
3.6.2.1.	Gegenfärbung der UEA I- markierten Präparate mit DAPI	45
3.6.3.	Übersichtsfärbungen	45
3.6.3.1.	Paraffineinbettung	46
3.6.3.2.	Elastika van Gieson- Färbung	46
3.6.3.3.	Kalzifizierungsnachweis	47
3.6.3.3.1.	Versilberung nach „von Kossa“	47
3.7.	Tierversuche	48
3.7.1.	Vorbereitung der klappentragenden Venensegmente auf die Implantation	49
3.7.2.	Implantation	50
3.7.2.1.	Narkose	50
3.7.2.	Explantation der klappentragenden Segmenten der <i>Venae jugularis externa</i>	50
3.7.4.	Implantation der klappentragenden Venensegmente	51
3.7.4.1.	Explantation der klappentragenden Venensegmente	51
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>52</b>
4.1.	Dezellularisierung	52
4.1.1.	Dezellularisierung mit Trypsin/ EDTA	52
4.1.2.	Dezellularisierung mit zwei unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen (A+B Methode)	53
4.1.3.	Dezellularisierung mit Aqua dest.	54

---

4.1.4.	Dezellularisierung nach Meezan	55
4.1.5.	Dezellularisierung mit Natriumdesoxycholat	56
4.1.6.	Auswahl der Dezellularisierungsmethode	57
4.1.6.1.	Bestimmung des DNS- Gehaltes in den dezellularisierten Segmenten	58
4.1.6.2.	Gelelektrophorese aufgereinigter DNS- Proben	59
4.1.7.	Elastika van Gieson-Färbung der azellulären Venensegmente	60
4.2.	Kultivierung primärer Zellen	61
4.2.1.	Charakterisierung der primären Zellkulturen vor der Rebesiedlung	62
4.2.1.1.	Endothelzellen	63
4.2.2.	Myofibroblasten	65
4.3.	Rebesiedlung	67
4.3.1.	Zweidimensionale Rebesiedlung in einer Kulturplatte (mit 24 Vertiefungen)	67
4.4.	Dreidimensionale Rebesiedlung klappentragender Venensegmente im Bioreaktor	68
4.5.	Charakterisierung dreidimensional rebesiedelter Segmente	69
4.5.1.	Elastika van Gieson-Färbung	69
4.5.2.	H&E-Färbung	70
4.5.3.	Immunhistochemische Charakterisierung	71
4.5.3.1.	Endothelzellen	71
4.5.3.2.	Myofibroblasten	71
4.6.	Tierversuche	73
4.6.1.	Auswertung der Autotransplantate	74
4.6.1.1.	Explantation	74
4.6.1.2.	Übersichtsfärbungen der Autotransplantate	75
4.6.1.3.	Kalzifizierungsnachweis nach „von Kossa“	75
4.6.1.2.	Immunhistochemische Auswertung der Autotransplantate	76
4.6.1.2.1.	Endothelzellen	76
4.6.1.2.2.	Glatte Muskelzellen	77
4.6.1.2.3.	Leukozytennachweis	77
4.6.1.2.4.	Prokollagen Typ I Synthese	77
4.6.2.	Auswertung der azellulär implantierten Venensegmente	79
4.6.2.1.	Explantation	79
4.6.2.2.	Übersichtsfärbungen der azellulär implantierten Explantate	80
4.6.2.2.1.	Hämalaun und Eosin Färbung	80
4.6.2.2.2.	Elastika van Gieson-Färbung	80
4.6.2.3.	Kalzifizierungsnachweis nach „von Kossa“	80
4.6.2.4.	Immunhistochemische Auswertung der azellulär implantierten Venensegmente	84
4.6.2.4.1.	Endothelzellen	84
4.6.2.4.2.	Glatte Muskelzellen	84
4.6.2.4.3.	Leukozytennachweis	85
4.6.2.4.4.	Prokollagen Typ I Synthese	85
4.6.3.	Auswertung der <i>in vitro</i> rebesiedelten Venensegmente nach Implantation	88
4.6.3.1.	Explantation	88
4.6.3.2.	Übersichtsfärbungen der <i>in vitro</i> rebesiedelten Segmente nach Implantation	89
4.6.3.2.1.	Hämalaun und Eosin-Färbung	89
4.6.3.2.2.	Elastika van Gieson	89
4.6.3.3.	Kalzifizierungsnachweis	89

---

4.6.4.	Immunhistochemische Charakterisierung <i>in vitro</i> rebesiedelter implantierter Venenklappensegmente nach Explantation	93
4.6.4.1.	Endothelzellen	93
4.6.4.2.	Glatte Muskelzellen	93
4.6.4.3.	Leukozytennachweis	94
4.6.4.4.	Prokollagen I Synthese	95
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>97</b>
5.1.	Tissue Engineering	97
5.2.	Kardiovaskuläres Tissue Engineering	97
5.3.	Arbeitshypothese	99
5.4.	Azellularisierung von klappentragenden Venensegmenten	99
5.5.	Kultur primärer Zellen	101
5.6.	Rebesiedlung	101
5.7.	Charakterisierung der rebesiedelten Segmente	102
5.8.	Tiermodell	103
5.9.	Autotransplantate	103
5.10.	Azelluläre Explantate	104
5.11.	<i>In vitro</i> rebesiedelte Implantate	105
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>111</b>
	Abbildungsverzeichnis	119
	Tabellenverzeichnis	121

---

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

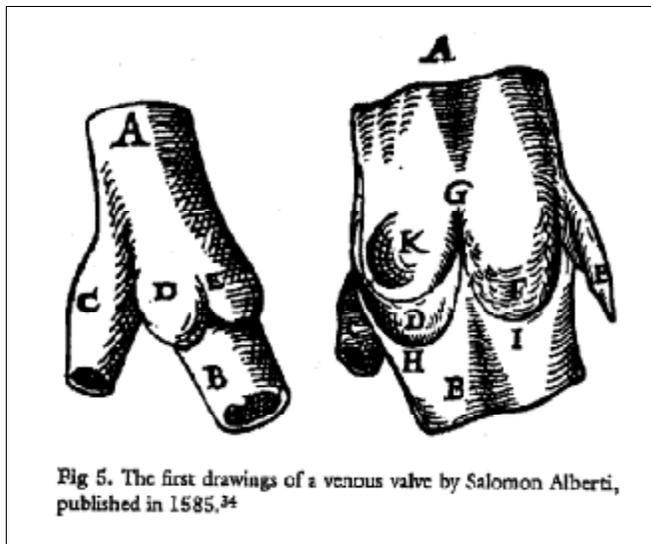
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillatum (destilliertes Wasser)
azellV	azelluläre Vene
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c.a.	circa
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzellen
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (und andere)
Fb	Fibroblasten
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
H&E	Hämalaun und Eosin
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IE	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
KU	Kunitz Einheiten
L	Lumen
M	Mol
M/V	Masse pro Volumen
MFb	Myofibroblasten
Min	Minuten
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
nI	Neo-Intima
noV	native ovine Vene
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salinelösung
POD	Peroxydase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Venenklappensegel
SMC	glatte Muskelzellen (smooth muscle cells)
Stabw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
UEAI	<i>Ulex europaeus agglutinin</i> Typ I
V/V	Volumen pro Volumen
vergl.	vergleiche
vWF	von Willebrand- Faktor
W	Wandbereich
z.B.	zum Beispiel

---

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Zur Geschichte der Venenklappen

Die Venenklappen wurden zum ersten Mal erwähnt im Jahr 1539 in dem berühmten Buch des Pariser Physikers Charles Estienne „*De Dissectione Partium Corporis Humani Libri Tres*“, welches allerdings erst 1545 veröffentlicht wurde (Scultetus et al., 2001). Estienne beschrieb sie damals als „*apophyses membranorum*“ in der Lebervene, konnte ihnen aber keine Funktion zuordnen. Fälschlicherweise vermutete er, dass diese Strukturen dazu da wären, um das Blut, von dem er annahm, dass es in der Leber gebildet wird, am „Wegfließen“ zu hindern. Etwa zur gleichen Zeit bemerkten andere Ärzte und Wissenschaftler unabhängig voneinander diese venösen Besonderheiten, sie wurden jedoch als Artefakte gewertet und nicht weiter verfolgt (Scultetus et al., 2001). Aus dieser Zeit stammte auch die allererste Zeichnung einer Venenklappe von einem Deutschen namens Salomon Alberti aus Nürnberg (Alberti, 1585, s. Abb. 1). Die eigentliche „Entdeckung“ der Venenklappen geht jedoch zurück auf Hieronymus Fabricius ab Aquapendente, welcher sie 1603 sorgfältig und detailliert beschrieb und in seinem Buch „*De Venarum Ostioliis*“ veröffentlichte (Franklin, 1927 und Leibowitz, 1957). Auch er erkannte jedoch nicht die hämodynamische Funktion der von ihm entdeckten Strukturen, da zu der Zeit die Zirkulation des Blutes noch weitgehend unbekannt war. Erst William Harvey, ein junger englischer Student von Fabricius ab Aquapendente erkannte bei der Untersuchung von Herzklappen, dass das Blut vom Herzen weg in die Aorta fließt und zum Herzen hin in der *Vena cava* (Harvey, 1628 und Lyons und Petrucelli, 1978). Er legte somit den Grundstein für das Verständnis der Blutzirkulation.



**Abb. 1:** Die erste Zeichnung einer Venenklappe von Alberti, 1585, aus Scultetus und Mitarbeiter (2001).

## 1.2. Aufbau der Vene und der Venenklappen

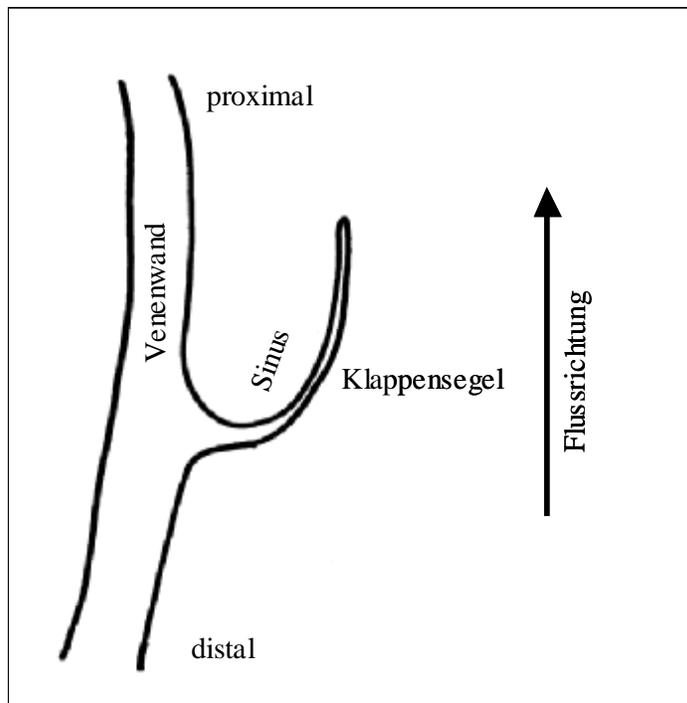
Aufgrund der niedrigeren Druckverhältnisse in einem Niederdrucksystem ist die Venenwand dünner als die der Arterien. Außerdem ist die Venenwand lockerer und unregelmäßiger gebaut, die einzelnen Schichtungen lassen sich weniger deutlich voneinander trennen.

Die *Tunica intima* ist die innerste Schicht und somit dem Blutstrom ausgesetzt. Sie besteht aus Endothelzellen, die einschichtig in die extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Dieses Endothel ist antithrombogen, das heißt es verhindert eine Anheftung von Plättchen und die daraus resultierende Thrombusformation (Thum et al., 2000; Mann und West, 2001). Die *Tunica media* schließt sich direkt an und besitzt ringförmig angeordnete Muskelfaserbündel, bestehend aus glatten Muskelzellen. Dazwischen liegen mehrere längs angeordnete Kollagenfasern, die miteinander vernetzt sind, sowie ein Netz aus elastische Fasern. Beide verlaufen annähernd achsenparallel (Sanchez-Hanke et al., 2000). Die *Tunica adventitia* als Abschlusschicht besteht hauptsächlich aus kollagenen Fasern und Fibroblasten.

Die Venenklappen (*Valvulae venosae*) sind Ausstülpungen der Intima und Media. Die Klappensegel bestehen aus einer Endothelfalte, welche durch die Einlagerung engmaschiger kollagener Fasergeflechte versteift ist und weder glatte Muskelzellen noch Gefäße enthält (Sanchez-Hanke et al., 2000). Diese Endothelfalten bilden Venenklappensegel, die sich in der Regel paarweise gegenüberstehen (bicuspidale Klappe). Sie weichen bei herzwärts gerichtetem Blutstrom auseinander und verhindern durch Klappenschluss den Rückfluss

(Schiebler et al., 1995). Darüber hinaus sind die Venenklappen so angeordnet, dass der Blutfluss nur von distal nach proximal gerichtet ist (s. Abb. 2).

Eine Dysfunktion der Venenklappen kann weitreichende Störungen im menschlichen Körper verursachen, wie zum Beispiel Varikose („Krampfadern“, Ludbrook, 1963 und Madar, 1986) und chronische venöse Insuffizienz (CVI; Markel et al., 1992 und Bosanquet und Franks, 1996).



**Abb. 2:** *Schema eines Venenklappensegels*

### 1.3. Das venöse Rückflusssystem

Bei allen Metazoen spielt die Körperbewegung eine beträchtliche Rolle bei der Bewegung der Blut- und Körperflüssigkeiten (Storch und Welsch, 1994). Auch bei den Säugetieren unterstützt die Kontraktion der Skelettmuskulatur den Flüssigkeitsstrom in Venen und Lymphgefäßen. Vor allem gerät das Blut durch den regelmäßigen Schlag des Herzens in Bewegung, wobei ventilartige Klappen in Herz und Venen eine gleichbleibende Richtung vorgeben. Dadurch und durch die charakteristische Elastizität der Blutgefäße kann ein gleichbleibender Blutdruck im Organismus gewährleistet werden. Dieser konstante Druck ist wichtig für die gleichbleibende Versorgung lebenswichtiger Organe und Gewebe, die zum Teil empfindliche Zellen besitzen (z.B. das Gehirn).

Das venöse Blut des Gehirns wird durch die inneren Halsvenen (*Venae jugularis interna*), in die auch das meiste Blut aus Kopf- und Halsregion fließt, und über die äußeren Halsvenen (*Venae jugularis externa*) abgeleitet. Das gesamte Blut wird in der oberen Hohlvene gesammelt, die in den rechten Herzvorhof mündet. Das Blut aus den unteren Körperbereichen wird über das Venensystem in die untere Hohlvene transportiert, die ebenfalls in das rechte Herz mündet. Im Bereich der Extremitäten werden drei verschiedene Venensysteme unterschieden: Das oberflächliche, das tiefe Venensystem und die Perforansvenen.

### **1.3.1. Oberflächliches Venensystem**

Die oberflächlichen Venen verlaufen oberhalb der Muskelhaut (Muskelfaszie; epifasziales Venensystem). Im Bereich der Beine existieren gleich zwei große oberflächliche Venenstämme. Der eine Venenstamm beginnt am Innenknöchel des Fußes und verläuft über die Unterschenkelinnenseite, die Innenseite des Knies und des Oberschenkels bis zur Leiste (*Vena saphena magna*). Der zweite Venenstamm beginnt hinter dem Außenknöchel und zieht an der Hinterseite der Wade zur Kniekehle (*Vena saphena parva*). Beide Venenstämme münden in das sogenannte tiefe Venensystem, welches unterhalb der Muskelfaszie verläuft (subfasziales Venensystem).

### **1.3.2. Tiefes Venensystem**

Die tiefen Venen der unteren Extremitäten sind meist paarweise angelegt und verlaufen parallel zu den entsprechenden Arterien, wie z.B. die *Venae tibiales anteriores* und die *Venae tibiales posteriores* (vordere und hintere Schienbeinvenen). Aus dem Unterschenkel transportieren drei tiefe Venenpaare das Blut zur Kniekehlenvene, aus der sich die Oberschenkelvene fortsetzt.

### **1.3.3. Perforansvenen**

Die Perforansvenen sind Verbindungsvenen zwischen dem tiefen und dem oberflächlichen Venensystem. In jedem humanen Bein gibt es etwa 150 Perforansvenen zwischen tiefem und oberflächlichem Venensystem der unteren Extremitäten.

### **1.3.4. Mechanismen zum Rücktransport des venösen Blutes zum Herzen**

Das Blut wird, vom Herzen ausgehend, über die Arterien zu den einzelnen Organen des Körpers transportiert. Dabei fällt der Blutdruck bis zu den kleinsten Kapillaren und

schließlich zu den Venen soweit ab, dass die Pumpleistung des Herzens, insbesondere in den Beinvenen, nicht mehr ausreicht, um das Blut entgegen der Schwerkraft wieder zum Herzen zurückzuleiten. Der Rücktransport des venösen Blutes geschieht über aktive oder passive Transportmechanismen.

#### **1.3.4.1. Passiver Transportmechanismus**

Die passiv treibende Kraft des venösen Blutes ist das sogenannte Druckgefälle. Hierbei handelt es sich um einen Druckunterschied, der zwischen der linken (Hochdrucksystem) und der rechten Herzhälfte (Niederdrucksystem) besteht. Dieses Druckgefälle ermöglicht den Rücktransport des venösen Blutes beim liegenden und stehenden Menschen, in Ruhe und bei Muskelarbeit.

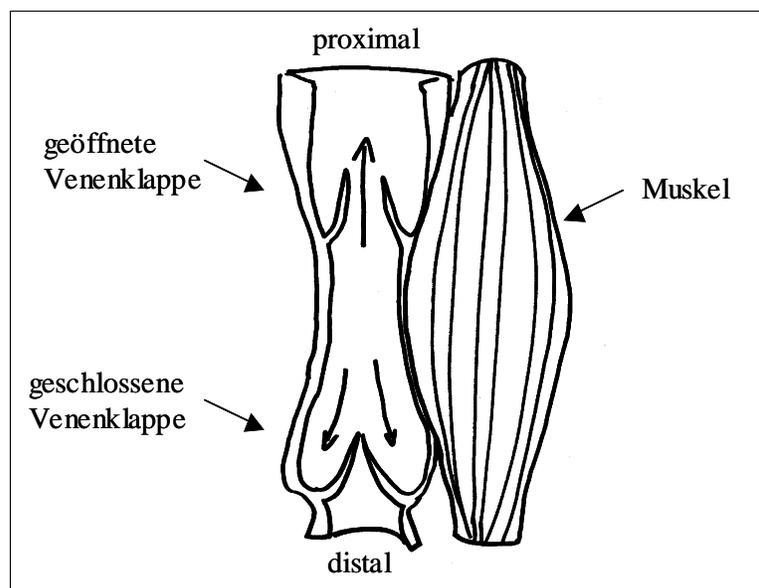
#### **1.3.4.2. Aktive Transportmechanismen**

Durch die Bewegung des Brustkorbes und des Zwerchfells bei Ein- und Ausatmung wird Druck und Sog in den Venen erzeugt. Das Tieferlegen des Zwerchfells beim Einatmen bewirkt in den Körpervenen unterhalb des Zwerchfells eine Druckerhöhung und in den Körpervenen oberhalb des Zwerchfells eine Drucksenkung (Sogwirkung). Die Ausatmung, bei der das Zwerchfell angehoben wird, hat eine Sogwirkung auf den Blutfluss in den Beinvenen zur Folge und führt zur Öffnung der Venenklappen. In den Venen oberhalb des Zwerchfells wird wiederum ein Überdruck mit Venenklappenschluss und Blutströmungsstopp erzeugt.

#### **1.3.4.3. Muskelpumpe**

Ein weiterer aktiver Transportmechanismus, der den Rückfluss des venösen Blutes aus den Extremitäten zum Herzen hin ermöglicht, wird als „Muskelpumpe“ bezeichnet. Das Prinzip der Muskelpumpe funktioniert nur in den Venen des subfaszialen Systems und nicht in den Venen, die oberflächlich unter der Haut liegen und nicht von Muskulatur umgeben sind (epifasziale Venen). Werden die Beine bewegt, drücken die arbeitenden Muskeln auf die Venenwände. Dadurch gerät das Blut in den Venen in Bewegung. Die Richtung des Blutflusses wird dabei durch die Venenklappen bestimmt, die eine Ventilfunktion ausüben und das Blut nur in Richtung Herz durchlassen (s. Abb. 3). Erschlaffen die Muskeln bei Stillstand der Beine, wird das Blut aus den peripheren Venen angesogen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Rückfluss des Blutes im venösen System durch zwei physikalische Prozesse gewährleistet ist, zum einen der durch Herz- und Muskelaktion entstehende Unterdruck und zum anderen durch die Ventilfunktion der sich öffnenden bzw. sich schließenden Venenklappen. Pathologische Prozesse im menschlichen Organismus führen zur Schädigung bzw. Zerstörung der Venenklappensegelstrukturen. Diese Vorgänge bilden die Grundlage für die im Folgenden näher erläuterte chronisch venösen Insuffizienz.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Venenklappenfunktion durch Einsatz der Muskelpumpe.

*Die physiologische Flussrichtung des Blutes verläuft von distal nach proximal*

#### 1.4. Chronisch venöse Insuffizienz

Die chronisch venöse Insuffizienz (CVI) fasst, als funktioneller Begriff, die klinischen Folgeerkrankungen einer chronisch venösen Abflussstörung, meist der unteren Extremitäten, bei dekompensierter primärer Varikose („Krampfadern“) oder beim postthrombotischen Syndrom zusammen. Die chronisch venöse Insuffizienz ist zurückzuführen auf die Dysfunktion von Venenklappen in den unteren Extremitäten und der Beckenregion und des daraus resultierenden venösen Refluxes (Gruss, 2001). Ursache der Dysfunktion der Venenklappe ist häufig die Beschädigung der Venenklappensegel durch einen Thrombus nach einer tiefen Venen- Thrombose (Gomez-Jorge et al., 2000). Gründe einer solchen tiefen Venen- Thrombose können ein chirurgischer Eingriff, Schwangerschaft, Verletzung oder zum

Beispiel ein Beinbruch sein (Gomez-Jorge et al., 2000). Die chronisch venöse Insuffizienz ist sowohl von großer medizinischer als auch von sozioökonomischer Bedeutung (Augustin et al., 1999). Fortschritte im Verständnis und der Behandlung dieser Erkrankung und ihrer unmittelbaren Folgen bleiben deutlich hinter denen in der Therapie arterieller Erkrankungen zurück, obwohl hier ebenfalls eine sehr große Zahl von Patienten betroffen ist (Kurz et al., 1999). Die komplexe Pathophysiologie venöser Probleme, das Fehlen anerkannter Evaluationsstandards und entsprechenden Ersatzes von Prothesen sind nur einige Faktoren die zu dieser Entwicklung geführt haben. Neue Erkenntnisse in der Technologie, Klassifizierung und der Grundlagen könnten den Weg für innovative therapeutische Ansätze in der nächsten Dekade ebnen (Dalsing et al., 1998). Zur Zeit gibt es für die chronisch venöse Insuffizienz keine allgemein anerkannte kausale Therapie.

#### **1.4.1. Epidemiologie und soziale Auswirkungen**

Die chronisch venöse Insuffizienz ist das häufigste Problem in der Medizin der Gefäßkrankheiten. Neben ihrer Mortalität ist die Venenthrombose deshalb von hohem Belang, weil sie die wesentliche Ursache für die chronische venöse Insuffizienz ausmacht. Die chronische venöse Insuffizienz aller Schweregrade hat eine Prävalenz von 12%-15%, die Häufigkeit des *Ulcus cruris venosum* („offenes Bein“) wird für die westlichen Industrienationen mit ca. 1% (Lebenszeitprävalenz) bzw. 0.1%-0.2% (Punktprävalenz) angegeben (Kurz et al., 1999; Widmer et al., 1982; Madar et al., 1986; Moneta et al., 2000 und Gruss, 2001). Es handelt sich demnach bei der chronischen venösen Insuffizienz um eine "Volkskrankheit". Sie bürdet dem Gesundheitssystem in Deutschland bei 1,8 Millionen Krankenhausbehandlungstagen eine Last von ca. 1,2 Milliarden Euro im Jahr auf, der Gesellschaft insgesamt die zusätzliche Belastung mit 2,5 Millionen Arbeitsunfähigkeitstagen im Jahr und eine Vielzahl vorzeitiger Berentungen. Für die betroffenen Patienten stellt sie eine erhebliche Verschlechterung der Lebensqualität dar, die von der Einschränkung des Aktivitätsspielraums über Schmerzen jeden Schweregrades bis hin zur vollständigen sozialen Isolation reicht (Bergemann et al., 1999). Ein Drittel aller CVI- Patienten erkrankt aufgrund einer postthrombotischen Genese, zwei Drittel als Folge einer primären Varikosis, wobei Frauen häufiger an einer CVI erkranken als Männer (Moneta et al., 2000).

#### **1.4.2. Wiederherstellung der Venenklappenfunktion**

Konventionell wird die chronische venöse Insuffizienz durch Kompression des gelockerten Bindegewebes mit Hilfe der sogenannten „Gummistrümpfe“ therapiert. Ziel dieser

Kompressionstherapie ist die Verringerung des venösen Durchmessers, die aber nur funktioniert, solange die Segel der Klappen nicht zu stark beschädigt sind und sich der Reflux des Blutes „nur“ auf die ausgeleierte Venenwand im Bereich der Klappe begründet. Eine weitere Methode die dilatierte Venenwand zusammenzudrücken ist eine chirurgische, die sogenannte Valvuloplastie, die zum Teil schon angewandt wird (Makarova et al., 2001) oder sich noch in der Tierversuchsphase befindet (Qui et al. 1995, Belcaro et al., 2000). Sind jedoch die Segel der Klappen zerstört, gibt es nur wenige Möglichkeiten, die Funktion der Klappen wiederherzustellen. Bis zu einem gewissen Grad der Degeneration der Venenklappenregel, ist es auch noch bedingt chirurgisch möglich, die Segel an der Venenwand „festzunähen“, um diese so zu straffen (Kistner, 1968 und 1990). Sind die Klappen unwiederbringlich zerstört, hilft nur noch eine Transplantation einer „gesunden“ autologen Venenklappe aus einem anderen Körperbereich des Patienten (Taheri et al., 1982) oder einer allogenen kryokonservierten Klappe (Burkhart et al., 1997 und Dalsing et al., 1999). Doch auch diese Methoden beinhalten zum einen das Problem der limitierten Verfügbarkeit und im Falle der allogenen Klappen, eine dauerhafte Immunsuppression der betroffenen Patienten um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden. Optimal wäre ein klappentragendes Transplantat, welches (1.) suffiziente Venenklappen besitzt, (2.) *in vitro* hergestellt werden kann, um die Verfügbarkeit zu gewährleisten und (3.) keine Immunsuppression erforderlich macht. Um das Ziel der *in vitro*-Herstellung klappentragender venöser Segmente realisieren zu können, bieten sich Methoden des Tissue Engineering an.

### **1.5. Tissue Engineering**

Organversagen und Gewebeverlust sind die größten und kostspieligsten Probleme in der Medizin (Langer und Vacanti, 1993). Seit 1954, als Murray und Mitarbeiter die erste erfolgreiche Organtransplantation durchführten, haben verschiedenartigste Transplantationen von allogenen Spenderorganen oder mechanischen Prothesen die Situation und das Überleben von Patienten signifikant verbessert (Vacanti, 1988; Fuchs et al., 2001). Obwohl jedes Transplantat einen Fremdkörper im Empfängerorganismus darstellt, konnte dieser Schritt möglich gemacht werden durch die Fortschritte in der Transplantationsbiologie, der Immunologie und durch die Entwicklung zahlreicher immunsuppressiver Agentien, die für die Nachbehandlung der Patienten mit Organ- oder Gewebetransplantaten notwendig sind. Leider stellen diese Organ- und Gewebetransplantationen keine perfekte Lösung dar, da eine große Diskrepanz besteht zwischen der Anzahl der Organspender und der Patienten, die dringend auf Organtransplantate angewiesen sind. 1989 warteten in den USA 19.095 Patienten auf ein

Organ, während sich bis Mai 2002 diese Anzahl auf 79.733 erhöht hat. Die Anzahl der durchgeführten Transplantationen belief sich hingegen im gesamten Jahr 2001 auf insgesamt 24.076 (United Network Of Organ Sharing, 2002). Zusätzlich erwartet die Transplantatempfänger eine lebenslange Immunsuppression, dadurch bedingte erhöhte Risiken von Infektionen, Tumorentwicklungen und eine ganze Reihe von weiteren Nebenwirkungen. Der Ersatz von Organen oder Organteilen durch mechanische Prothesen oder künstliche Organe ist ebenfalls limitiert durch ein hohes Infektionsrisiko, Thrombosierung der Prothesen und durch deren geringe Haltbarkeit (Fuchs et al., 2001). Aufgrund dieser massiven Defizite entwickelte sich das Arbeitsgebiet des Tissue Engineerings, welches die *in vitro* Züchtung autologer bioartifizieller Ersatzgewebe zum Ziel hat. Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Feld an dem sowohl Naturwissenschaftler, als auch Mediziner und Ingenieure beteiligt sind (Langer und Vacanti, 1993; Vacanti und Langer, 1999). Von Skalak und Fox wurde es 1988 als „Anwendung der Prinzipien und der Methoden der Materialforschung- und der Lebenswissenschaften für das fundamentale Verständnis von Struktur und Funktion normaler und pathologisch veränderter Gewebe, und der Entwicklung von biologischen Substituten zur Reparatur, Erhaltung und Verbesserung der Gewebefunktion“ definiert (Skalak und Fox, 1988). Das Ziel des Tissue Engineering ist der Ersatz von beschädigten, funktionsbeeinträchtigten oder fehlenden Organen oder Geweben durch biologisch kompatible Substitute. Die aktuellen Konzepte zur *in vitro* Generierung von Geweben oder Organen sind vielfältig. Allen gemein ist aber die Notwendigkeit einer dreidimensionalen Matrixstruktur und Zellen des späteren Implantatempfängers (autologe Zellen). Nach Isolation der autologen Zellen werden diese durch Zellkulturtechniken vermehrt, bis eine genügende Anzahl für die Besiedlung einer Matrixstruktur erreicht ist. Zwei relativ „einfache“ tissue engineerete Gewebetypen haben bereits klinische Anwendung gefunden, und zwar Haut- und Knorpelgewebe (Walgenbach et al., 2001), während das Tissue Engineering anderer Systeme wie Nervengewebe, Kornea, Leber, Pankreas, Nierentubuli, Harnblase, Muskel, Knochen und kardiovaskuläres Gewebe (inklusive Blutgefäße) zur Zeit intensiv untersucht wird.

### **1.5.1. Tissue Engineering von Blutgefäßen**

Die Entwicklung autologisierter Blutgefäße *in vitro* hat in den letzten 20 Jahren im Bereich „kardiovaskuläres Tissue Engineering“ sehr stark zugenommen. Hierfür wurden verschiedenste Methoden entwickelt, um sowohl arteriellen als auch venösen Strukturen biologische Funktionalität zu verleihen. An einem Ersatz von Blutgefäßen wird vor allem im

Bereich von Koronararterien gearbeitet, die sich bei Atherosklerose verengen, und so einen Herzinfarkt auslösen können (Nerem und Seliktar, 2001). Des weiteren gibt es Bestrebungen Aorten (Clarke et al., 2001), kleinelumige Arterien (Conte, 1998, Niklason et al., 1999 und Huynh et al., 1999) und auch venöse Abschnitte zu entwickeln (Liu, 1998; Liu et al., 2000 und Watanabe et al., 2001).

Für das Tissue Engineering solcher Blutgefäße gibt es verschiedenartigste Konzepte. Zum einen werden zu Röhrenstrukturen geformte Polymerverbindungen oder zuvor dezellularisierte Gefäßsegmente implantiert und im Empfängerorganismus *in vivo* rebesiedelt. („guided tissue regeneration“, Skalak und Fox, 1991 und Stock et al., 2001). Zum anderen gibt es Methoden, xenogene biologische Matrices mit Glutaraldehyd zu fixieren, um Oberflächenantigene auf den Spenderzellen zu maskieren, mit dem Ziel eine Immunantwort im Empfängerorganismus zu unterdrücken und um das Gewebe gegen enzymatische Degradation zu stabilisieren (Gomez-Jorge et al., 2000, Meuris et al., 2001 und Clarke et al., 2001). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass diese Glutaraldehyd- fixierten Gewebe *in vivo* sehr schnell kalzifizieren (O'Brien et al., 1999). Als drittes Konzept, welches auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt wurde, werden dezellularisierte biologische Matrices oder zu Röhrenstrukturen geformte Polymerverbindungen *in vitro* mit autologen Zellen rebesiedelt, bevor eine Implantation in den Empfängerorganismus erfolgt. Ziel ist es hierbei, dem Implantat bereits *in vitro* die nötige Stabilität durch eine Rebesiedlung mit interstitiellen Zellen wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen zu verleihen, und zum anderen, das Lumen des Implantates mit Endothel auszukleiden, um eine Thrombozytenanlagerung im Empfängerorganismus zu verhindern. Die in den letzten Jahren entwickelten Polymerverbindungen sind ebenso wie biologische Matrices enzymatisch degradierbar, das heißt, die aufgesiedelten autologen Zellen sind innerhalb einer gewissen Zeit in der Lage, die „fremde“ Matrix in ein völlig körpereigenes Produkt umzuwandeln. Bei diesen synthetischen, degradierbaren Matrices handelt es sich überwiegend um PGA (Polyglycolic acid) und um dessen Kopolymere (Vacanti et al., 1988, Niklason et al., 1999, Kim et al., 2000, Kim et al., 2001 und Watanabe et al., 2001). Um klappentragende Venensegmente *in vitro* herzustellen, ist es jedoch nicht möglich auf Polymerverbindungen zurückzugreifen, da diese die Herstellung solch filigraner Strukturen wie die der Venenklappensegel nicht zulassen. Als dreidimensionale Gerüststruktur wurde daher eine biologische Matrix ausgewählt, die der Größe einer humanen Saphena Vene entspricht und Klappentragend ist: die ovine *Vena jugularis externa*. Das Schafmodell, insbesondere das des wachsenden Schafes, wurde weiterhin ausgewählt, da sich hier Kalzifizierungserscheinungen besonders schnell entwickeln

(Brown et al, 1991 und Dohmen et al., 2001). Außerdem haben biologische Matrices gegenüber synthetischen den Vorteil, dass bereits alle Bindegewebskomponenten bis auf die Zellen in ihrer natürlichen Zusammensetzung vorliegen. Im weiteren wird die Zusammensetzung des Bindegewebes beschrieben.

## **1.6. Bindegewebe**

Bindegewebe kommt ubiquitär im ganzen Körper vor und verbindet Gewebe der Organe. Es besteht nicht aus geschlossenen Zellverbänden, sondern weist zum Teil große interzelluläre Räume zwischen den Zellen auf. Vom Epithelgewebe ist das Bindegewebe durch eine Basalmembran getrennt. Während der frühen Embryonalentwicklung entsteht es aus dem Mesoderm und der Neurralleiste. Im Embryo bildet sich als frühe Differenzierungsstufe das primitive Mesenchym. Dieses besteht aus zwei Komponenten, zum einen aus fixen und mobilen Bindegewebszellen und zum anderen aus Interzellulärsubstanzen.

Das Bindegewebe besitzt zahlreiche Funktionen, in erster Linie mechanische, als Verbindung, Stütze oder Umhüllung. Zum anderen dient es dem Stoffaustausch und dem Speichern von Flüssigkeiten in den Interzellularräumen (Silbernagl und Despopoulos, 1991). Des weiteren besitzt Bindegewebe Reparatureigenschaften, wie zum Beispiel die Bildung von Narbengewebe bei Verletzungen durch Kollagen I und III (Sun und Weber, 2000).

### **1.6.1. Bindegewebszellen**

Ortsständige (fixe) Zellen wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen liegen konstant im Bindegewebe. Aufgabe dieser fixen Zellen ist vor allem die Synthese von Interzellulärsubstanzen. Sie sind in der Lage, alle extrazellulären Matrix-Komponenten zu bilden und beteiligen sich andererseits auch an deren Abbau im Rahmen von Erneuerungsprozessen („turnover“). Mit den extrazellulären Strukturen verbunden sind diese Zellen über Integrine.

Fibroblasten sind schmale, spindelförmige Zellen. Sie enthalten viel raues endoplasmatisches Retikulum (reR), einen gut entwickelten Golgi-Apparat, einen großen länglichen Zellkern mit mehreren Nukleoli und sekretorische Vesikel. Aufgrund ihrer hohen sekretorischen Aktivität produzieren Fibroblasten zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), wie zum Beispiel Fibronectin, Vitronectin, Kollagen Typ I, III und IV sowie einige andere ECM- und ECM- verwandte Proteine (MacKenna et al., 2000).

Glatte Muskelzellen sind vor allem in Blutgefäßen in verschiedenen phänotypischen Stadien zu finden (Moiseeva, 2001). Glatte Muskelzellen haben innerhalb des Bindegewebes viele

Funktionen, wie Adhäsion, Migration, Proliferation, Kontraktion, Differenzierung und Apoptose. Diese werden durch Oberflächenrezeptoren vermittelt, die auch für Zell-Zellverbindungen und Zell-extrazelluläre Matrix-Bindungen verantwortlich sind.

Neben den fixen Bindegewebszellen existieren auch zahlreiche mobile Zellen, die zwischen Bindegewebe und anderen Geweben wandern. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Leukozyten, wie zum Beispiel Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Plasmazellen, die die Blutbahn verlassen und in das Bindegewebe einwandern können. Hier sind sie an zahlreichen Abwehrreaktionen beteiligt. Besonders bei akuten und chronischen Entzündungen in Organen akkumulieren sie in deren Bindegeweben.

### **1.6.2. Extrazelluläre Matrix**

Die Interzellularsubstanz (extrazelluläre Matrix) zwischen Bindegewebszellen besteht aus azellulären, organischen Komponenten, die Produkte der Bindegewebszellen sind. Die geformten Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) werden als Fasern bezeichnet, die aus zwei verschiedenen Arten von Strukturproteinen bestehen, und zwar aus Kollagenfasern und elastische Fasern.

### **1.6.3. Grundsubstanz der extrazellulären Matrix**

Die Grundsubstanzen aller Bindegewebstypen enthält gemeinsame chemische Komponenten, unterscheiden sich aber durch den Einbau zusätzlicher Stoffe oder ihre besondere Strukturierung. Generell setzt sich die Grundsubstanz aus einem Maschenwerk von Makromolekülen zusammen, das aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften Flüssigkeit bindet (interstitielle Flüssigkeit). Weiterhin dient die Grundsubstanz zum Transport von Substanzen und zur Wanderung von Zellen. Zu den Hauptkomponenten der Grundsubstanz zählen Proteoglykane, Glykoproteine und Wasser.

#### **1.6.3.1. Proteoglykane**

Proteoglykane bestehen aus einer zentralen Proteinkette („core Protein“) von der verschiedene Glykosaminoglykanseitenketten abgehen. Die Glykosaminoglykane sind aus sich mehrfach wiederholenden Disacchariden aufgebaut und durch anhängende Sulfat- oder Carboxylgruppen negativ geladen. Hierdurch erlangen sie hydrophile Eigenschaften und sind in der Lage, Wasser zu binden. In verschiedenen Geweben werden zahlreiche Glykosaminoglykane unterschieden, wie Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat,

Keratansulfat, Heparansulfat und Heparin. Die Proteoglykane werden nach der Struktur ihrer core- Proteine in verschiedene Familien eingeteilt, wie Aggrecan (im Knorpel), Perlecan (in Basalmembranen), Versican (in Gefäßwänden), Decorin (im kollagenen Bindegewebe) und Syndecan (an Zellmembranen). Die räumliche Anordnung von Proteoglykanen in Bindegeweben und ihre Lage sind ausschlaggebend für Diffusionsvorgänge in diesen Geweben. Ihre Zusammensetzung und Struktur sind verantwortlich für die physikalischen Eigenschaften von Bindegewebetypen und bestimmen, ob deren Struktur fest, viskös oder elastisch sind.

### **1.6.3.2. Glykoproteine**

Glykoproteine sind aus neutralen Polysacchariden und Proteinen aufgebaute Verbindungen, bei denen der Proteinanteil gegenüber dem Zuckeranteil überwiegt. Im Bindegewebe beteiligen sie sich an der Strukturbildung und vermitteln Bindungen zwischen ECM-Proteinen und den entsprechenden Integrinen der Zellmembranen von Bindegewebszellen (Reissig und Schmidt, 1998). Neben Vitronektin, Laminin und Thrombospondin gehört Fibronektin zu den wichtigsten Glykoproteinen, da es zum einen die Adhäsion der Zellen an die ECM vermittelt (Rademacher et al, 2001), und zum anderen die ECM- Fasern untereinander verbindet.

### **1.6.4. Kollagenfasern**

Kollagen ist das häufigste Protein des menschlichen Körpers und bildet lange, unverzweigte Fasern von 1–20 µm Durchmesser. Kollagenfasern sind extrem zugfest, aber nicht dehnbar. Sie sind aufgebaut aus mehreren quergestreiften Fibrillen von 0,2–0,5 µm Durchmesser, die sich wiederum aus Mikrofibrillen (20–100 nm Durchmesser) zusammensetzen, die aus Primärfilamenten bestehen. Diese Primärfilamente sind fadenförmige Kollagenstrukturen mit Durchmessern kleiner als 5 nm. Sie bestehen aus Tropokollagenmolekülen, die sich ihrerseits aus Prokollagenmolekülen zusammensetzen.

Die vorherrschenden Aminosäuren der Kollagenproteine sind Glycin, Prolin und Hydroxyprolin. Je nach Zusammensetzung der Prokollagenmoleküle und der Anzahl der Prokollagene pro Primärfilament werden über 20 verschiedene Kollagentypen unterschieden. Die wichtigsten Kollagentypen und ihr Vorkommen sind in folgender Tabelle dargestellt:

**Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten Kollagen- Typen und ihr Vorkommen im Säuger- Organismus:**

<b>Kollagen- Typ</b>	<b>Vorkommen</b>
I	Ist besonders zugfest und bildet Bündel aus dickeren Fasern und macht 90 % aller Kollagene aus. Es kommt ubiquitär in allen Bindegeweben vor.
II	Ist druckelastisch und besteht aus dünneren Fasern die keine Bündel bilden. Es findet sich in hyalinem Knorpelgewebe, im Glaskörper des Auges und in der Bandscheibe.
III	Ist ein weit verbreitetes Kollagen in lockeren Bindegeweben und Narbengewebe. Es umhüllt glatte Muskelzellen.
IV	Tritt nur in Form von Filamenten auf, es bildet keine Fibrillen. Es ist in Blutgefäßen in der Basalmembran enthalten (Romanos et al., 1998).
V	Findet sich in Gefäßwänden um glatte Muskelzellen.
VII	Befindet sich ebenfalls in Gefäßwänden und dient dort zur Verankerung von Basalmembranen (sogenannte „Ankerfibrillen“)
VIII	wird nur von Endothelzellen produziert.
IX und XI	Treten zusammen mit Typ II- Fasern auf und sind in Knorpelgeweben zu finden.
X	Tritt in Wachstumszonen und Epiphysenfugen auf. Es wird von hypotrophen Chondrozyten produziert.

#### **1.6.4.1. Kollagenbiosynthese**

Zur Biosynthese, also zur Bildung und Vernetzung von Kollagen, sind eine Reihe von Zellen befähigt. Zu diesen zählen Fibroblasten, Osteoblasten, Chondroblasten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen. Zunächst kommt es in den Zellen am reR zur Bildung des Prokollagens durch Synthese einer  $\alpha$ -Helix aus Aminosäuretripletts von vor allem Prolin, Lysin und Glycin. Diese Aminosäurekette wird je nach herzustellendem Kollagentyp unterschiedlich hydroxyliert und glykosyliert. Nicht-helicale Telopeptide am Ende der Kette verhindern eine vorzeitige intrazelluläre Polymerisation. Drei  $\alpha$ - Helices bilden ein Prokollagenmolekül, in Form einer Tripel- Helix. Über Exozytose werden die Prokollagenmoleküle in den extrazellulären Raum ausgeschleust. Dort werden die Telopeptide abgespalten und es entsteht das Tropokollagen. Zwischen mehreren Tropokollagenmolekülen kommt es zu einer

Quervernetzung über Brückenbildung zwischen Lysinresten zu Primärfilamenten. Diese Primärfilamente lagern sich zu Mikrofibrillen zusammen.

Kollagene Fasern unterliegen einem sogenannten „turnover“, also einem ständigen Ab- und Aufbau. Proteolytische Enzyme, die für die Degradation des Kollagens verantwortlich sind, heißen auch Matrix- Metalloproteinasen (MMP's; Sun und Weber, 2000) und deren Inhibitoren „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMP's; Sun et al., 2000). Der Umbau von Kollagenen im Gewebe ist von verschiedenen Faktoren abhängig, vor allem aber von deren mechanischer Belastung. So kann es zum Beispiel bei längerer Nichtbeanspruchung zur Schrumpfung oder zum Verlust kollagener Fasern kommen. Andererseits kann es auch zu Störungen des turnovers mit einer überschüssigen Kollagenbildung, zur sogenannten Fibrose kommen (MacKenna et al, 2000)..

### **1.6.5. Elastische Fasern**

Elastische Fasern bilden durch zahlreiche Verzweigungen Netzwerke, sind sehr dehnbar und kehren nach Dehnung in ihre ursprüngliche Lage zurück. Sie kommen fast überall im menschlichen Körper vor, wie zum Beispiel im faserigen Bindegewebe, im Stroma verschiedener Organe oder in Organkapseln. Dort wo sie gehäuft auftreten, bedingen sie die elastischen Eigenschaften von Geweben oder Organen. Elastische Fasern sind aus zwei verschiedenen Komponenten aufgebaut, zum einen aus Elastin, welches den zentralen Anteil der Fasern bildet, und zum anderen aus Mikrofibrillen, die den Elastinanteil durchziehen und so ein peripher fädiges Netzwerk bilden. Ähnlich wie Kollagen enthält Elastin viel Glycin und Prolin, aber auch seltenere Aminosäuren wie Desmosin. Als Proelastin wird es zum Beispiel in der *Tunica media* von Blutgefäßen von Fibroblasten und glatten Muskelzellen synthetisiert und über Exozytose in den extrazellulären Raum geschleust, wo durch Quervernetzung Elastinstrukturen entstehen. Ebenso wie Kollagen kann Elastin durch spezielle Enzyme degradiert werden.

### **1.7. Ziel der vorliegenden Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von Methoden, um aufbauend auf diesen, *in vitro* körpereigene (autologe) klappentragende Venensegmente als potentielle Prothesen herzustellen. Um deren Funktion überprüfen zu können musste ein Tiermodell entwickelt werden, in dem die Machbarkeit der Transplantation untersucht wird. Ziel war also nicht die Beweisführung, dass mit der Transplantation ein krankhafter Zustand therapiert werden kann. Aus diesem Grund konnte nicht auf von Dalsing und Mitarbeitern zitierte Tiermodelle (1989)

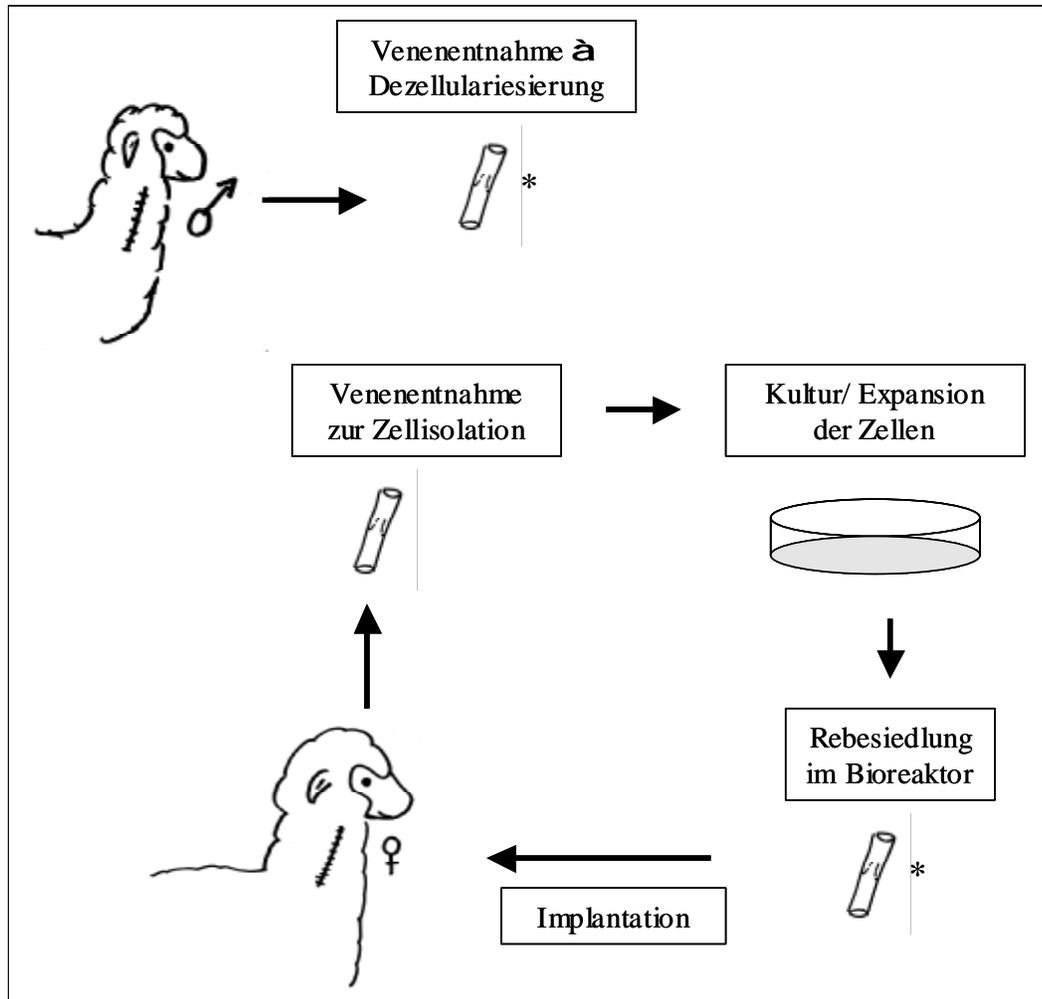
zurückgegriffen werden. In diesen Modellen konnte nach Hervorrufen einer Thrombose und anschließender Klappentransplantation in keinem Fall eine 100%ige Kompatibilität erreicht werden. Weiterhin sollte eine immunologische Abstoßungsreaktion durch die Verwendung autologer und nicht xenogener Klappen weitestgehend ausgeschlossen werden, wobei sowohl die Spendermatrix (allogen) als auch die eingesetzten Zellen (autolog) aus derselben Tierart stammen, in die auch transplantiert wird.

Das Gesamtziel war demnach die Entwicklung eines venösen klappentragenden Gefäßersatzes unter Verwendung zellkulturtechnischer Verfahren im Rahmen des *Tissue Engineering*. Für dieses Ziel sollte ein allogenes Modell im Schaf entwickelt werden. Um dies zu verwirklichen, wurden azelluläre klappentragende venöse Segmente mit glatten Muskelzellen (SMC) und Fibroblasten (Fb) im Bereich der Gefäßwand interstitiell und Endothelzellen (EC) auf der luminalen Oberfläche besiedelt. Ein wichtiges Kriterium war hierbei die natürlich vorkommende Zusammensetzung der zellulären (SMC, Fb und EC) und extrazellulären Komponenten (natürliche azelluläre Venenklappe). Die Arbeitshypothese beinhaltet, dass parallel zu einer Resorption der biodegradablen biologischen Matrix ein gradueller Ersatz der Trägerstrukturen durch vor Ort synthetisierte extrazelluläre Matrix mittels der angesiedelten autologen Zellen erfolgt. Diese Zellen (SMC und Fb) sollen, entsprechend ihrer physiologischen Funktion, auch spätere Reparaturprozesse vornehmen. Der Vorteil dieser potentiell biologisch umwandelbaren Matrix ist, dass nach Abschluss der Resorptionsprozesse so eine körpereigene Trägerstruktur im Organismus verbleibt. Durch eine vollständige Auskleidung der Segmente mit Endothel soll es auch während der *in vivo*-Phase zu keiner Antikoagulation oder Thrombozytenaggregationshemmung kommen.

### **1.8. Versuchsaufbau**

Um das Tissue Engineering von klappentragenden Venensegmenten zu etablieren, muss zuerst die Matrix, also die dreidimensionale Trägerstruktur dezellularisiert werden. Diese stammt aus einem männlichen Schaf. Parallel dazu werden Zellen des späteren weiblichen Implantatempfängers (autologe Zellen) aus einer Venenbiopsie isoliert und über Zellkulturtechniken expandiert. Sind genügend Zellen vorhanden, werden die zuvor dezellularisierten, klappentragenden Segmente des männlichen Schafes in einer dreidimensionalen Kultur mit diesen Zellen rebesiedelt. Sind die Zellen vollständig in die vorgegebene Matrix immigriert, werden die Tissue Engineerten Segmente in die weiblichen Schafe für 1 bis 6 Wochen implantiert (s. Abb. 4). In dieser *in vivo*-Phase sollen die

aufgesiedelten Zellen das „allogene“ Matrixmaterial des Spenders degradieren und durch neu synthetisierte ECM-Komponenten ersetzen.



**Abb. 4:** Schema zum Tissue Engineering von klappentragenden Venensegmenten im allogenen Schafmodell.

Vom männlichen Schaf wird die Jugularvene entfernt und dezellularisiert, sie liefert die dreidimensionale Gerüststruktur für die autologen Gefäßzellen, die aus einer Venenbiopsie von einem weiblichen Schaf isoliert und in Kultur expandiert werden. Nach Rebesiedlung der Gerüststruktur in einen Bioreaktor wird sie in das weibliche Schaf in Jugularvenenposition implantiert.

## **2. MATERIAL**

### **2.1. Tiere**

Die Genehmigung der Tierversuche wurde nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (BGB 1. I S. 1319) durch die Bezirksregierung Hannover erteilt. Auf die Einhaltung der Empfehlungen des National Institut of Health (USA) zum Umgang mit Versuchstieren wurde geachtet („guide for the care and use of laboratory animals“, 1996). Verwendet wurden Schwarzkopfschafe aus den Zuchten der Niedersächsischen Schafverwertung, Hannover, im Alter von 7 bis 11 Monaten bei der Erstoperation. Diese wurden in Gruppen von 2 bis 6 Tieren in den Ställen des Zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule Hannover (Leiter: Prof. Dr. med. vet. H. J. Hedrich) gehalten. Die Tiere wurden regelmäßig mit einer Zuchtdiät gefüttert und hatten kontinuierlichen Zugang zu Leitungswasser. Die Tiere wurden ständig fachtierärztliche betreut und vor Beginn jeder Narkose gewogen.

### **2.2. Chemikalien**

3-Aminopropyltriethoxy-silan, Art. Nr.: A3648 Fa. SIGMA

Aceton, Art. Nr.: 8003 Fa. BAKER

Albumin Fraktion V, bovine (BSA), Art. Nr.: A9418 Fa. SIGMA

Alzianblau, Art. Nr.: A 5268 Fa. SIGMA

Ammoniumhydroxid, Art. Nr.: A 6899 Fa. SIGMA

Brillant Crocein, Art. Nr.: 1B 109 (CI 75100) Fa. CHROMA

Buprenorphin, Fa. TEMGESIC

Braunoderm, Fa. B. BRAUN

Carboprofen (Rimadryl), Fa. PFIZER

Chloroform, Art. Nr.: L2432 Fa. SIGMA

Collagenase A, Art. Nr.: 103578 Fa. ROCHE

Corbit Balsam, Einschlussmittel für mikroskopische Techniken, Fa. HECHT

DAB Liquid + Substrat- Chromogen, Art. Nr.: K3468 Fa. DAKO

DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dilactate, Art. Nr.: D9564 Fa. SIGMA

Dimethylsulfoxid (DMSO), Art. Nr.: 1.02931.1000 Fa. MERCK

DNase Typ, Art. Nr.: I 104 159 Fa BOEHRINGER MANNHEIM

Eosin, gelblich, Art. Nr.: E-4382 Fa. SIGMA

Essigsäure Fa. BAKER

Ethanol für Molekularbiologie, Art. Nr.: 1.08543.0250 Fa. MERCK

Ethanol, ca. 98%, vergällt mit Methyl- Ethylketon, Art. Nr.: K928-4 Fa. ROTH

Ethidiumbromid-Lösung, Art. Nr.: E-1510 Fa. SIGMA

Fentanyl (Wirkstoff: Fentanyldihydrogencitrat), Fa. JANSSEN

Fluorescence Mounting Medium, Art. Nr.: 2627 Fa. DAKO

Formaldehyd, Art. Nr.: 1.03999.1000 Fa. MERCK

Gelatine Typ A, porcine skin, Art. Nr.: G-2500 Fa. SIGMA

Harris' Hämatoxylinlösung (Papanicolaou), Art. Nr.: 1.09253.0500 Fa. MERCK

Heparin (Liquemin), Fa.HOFFMANN- LA ROCHE

Isofluran (Florene, 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether), Fa. ABBOTT

Kaliumchlorid, Art. Nr.: P-4504 Fa. SIGMA

Kalziumchlorid, Art. Nr.: C-5080 Fa. SIGMA

Kernechtrot, Art. Nr.: 1A402 Fa. CHROMA

Lichtgrün SF gelblich, Art. Nr.: K22667741 Fa. MERCK

Meyers' Hämalanlösung, Art. Nr.: 1.09249.2500 Fa. MERCK

Natriumazid, Art. Nr.: K305.1 Fa. ROTH

Natriumchlorid, Art. Nr.: 1.06404.1000 Fa. MERCK

Natriumcitrat, Art Nr. 00280 Fa. BAKER

Natriumcitrat, Art. Nr.: S-4641 Fa. SIGMA

Natriumdesoxychololat, Art. Nr.: D-6750 Fa. SIGMA

Phosphorwolframsäure, Art. Nr.: 1.00583.0100 Fa. MERCK

---

Propofol (Propofol-Lipuro 1%), Fa. B. BRAUN

Pyrogallol, Art. Nr.: 1.006612.0050 Fa. MERCK

Resorcin-Fuchsin, Art. Nr.: 2E030 Fa. CHROMA

Ringer-Lösung, Fa. B. BRAUN

Saffron du Gatinais, Art. Nr.: 5A394 Fa. CHROMA

Salzsäure 25%ig, Art. Nr.: 1.00316.2511 Fa. MERCK

Salzsäure, Art. Nr. 1.09057.1000 Fa. MERCK

Säurefuchsin, Art. Nr. 1B525 Fa. CHROMA

Silbernitrat, Art. Nr.: 1.01512.0025 Fa. MERCK

Tardomyocel (Breitspektrum-Antibiotikum, 1 ml enthält: 82,6 mg Benzylpenicillin-Benzathin (100000 IE), 24,8 mg Bencilpenicillin-Procaïn (25000 IE), 156,3 mg Dihydrostreptomycinsulfat (125 mg Dihydrostreptomycin), 1,5 mg Methyl-4-hydroxybenzoat und 0,2 mg Propyl-4-hydroxybenzoat), Fa. BAYER

Tissue Tek O.C.T. Compound, Art. Nr.: 45983 Fa. SAKURA

TRI- Reagent, Art. Nr.: T9424Fa. SIGMA

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS Ultraqualität), Art. Nr.: 5429.1 Fa. ROTH

Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (TRIS- HCL), Art. Nr.: 1.08219.1000 Fa. MERCK

Trizol Reagent, Art. Nr.: 15596-026 Fa. INVITROGEN

Trypanblau, Art. Nr.: S11-004 Fa. PAA

Vectastain ABC-Kit, Art. Nr.: PK4000 Fa. VECTOR

Vybrant Cell Tracer Kit, Art. Nr.: V-12883 Fa. MOLECULAR PROBES

Wasserstoffperoxid 30%ig, Art. Nr.: 21,676-3 Fa. ALDRICH

Xylol, Art. Nr.: 8118 Fa. BAKER

### **2.3. Zellkulturmedien und Zusätze**

Amphotericin B, Art. Nr.: A2610 Fa. BIOCHROM

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit Natriumpyruvat, mit 4500 g/l Glucose, mit Pyridoxin HCL, Art. Nr.: 41965-039 Fa. GIBCO

Endothelial Cell Basal Medium, Art. Nr.: C-22210 Fa. PROMOCCELL

Fötales Kälberserum (FCS), Art. Nr.: 10270-106 Fa. GIBCO

HBSS (Hanks Balanced Salt Solution), Fa. SIGMA

Heparin, Art. Nr.: L6510 Fa. BIOCHROM

Penicillin/ Streptomycin, Art. Nr.: A2212 Fa. BIOCHROM

Phosphat Buffered Saline (PBS) ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , Art. Nr.: H15-002 Fa. PAA

Smooth Muscle Cell Basal Medium 2, Art. Nr.: C-22262 Fa. PROMOCCELL

Supplement Pack für Endothelial Cell Growth Medium, Art. Nr.: C-39210 Fa. PROMOCCELL

Supplement Pack für Smooth Muscle Cell Growth Medium 2, Art. Nr.: C-39262 Fa. PROMOCCELL

Trypsin/ EDTA 10x konzentriert, Art. Nr.: . L2153 Fa. BIOCHROM

#### Endothelzell- Kulturmedium (EC- Medium)

450 ml Endothelial Cell Basal Medium

50 ml FCS (10 % [V/V]), hitzeinaktiviert

5 ml Penicillin/Streptomycin (100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)

aus Supplement Pack für Endothelial Cell Growth Medium:

500µg/ 500 µl HC (1 µg/ml)

0,5 µg/ 500 µl hbFGF (1 ng/ml)

2 ml ECGS/H (0,4 % [V/V])

0,05 µg/ 500 µl hEGF (1 ng/ml)

#### Myofibroblasten- Kulturmedium (MFB- Medium)

450 ml Smooth Muscle Cell Basal Medium 2

50 ml FCS (10 % [V/V]), hitzeinaktiviert

5 ml Penicillin/Streptomycin (100 IE/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin)

aus Supplement Pack für Smooth Muscle Growth Medium 2:

2,5 mg/ 500 µl Insulin (5 µg/ml)

1 µg/ 500 µl hbFGF (2 ng/ml)

0,25 µg/ 500 µl hEGF (0,5 ng/ml)

#### **Stop- Medium**

450 ml DMEM

50 ml FCS (10 % [V/V])

5 ml Penicillin/Streptomycin (100 IE/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin)

### **2.3.1. Puffer und Lösungen**

---

### Waschpuffer für Immunhistochemie

5200 ml Tris HCL, pH 7 12,7 g/l (127 g/l)  
2,36 g l<sup>-1</sup> Tris Base, pH 7,5200 ml (23,6 g l<sup>-1</sup>)  
8,77 g l<sup>-1</sup> NaCl 60 ml (292,2 g l<sup>-1</sup>)  
0,29 g l<sup>-1</sup> CaCl 4 ml (147 g l<sup>-1</sup>)  
0,1 % BSA 2g 2000 ml<sup>-1</sup>  
Aqua dest. 1536 ml

### Agarose-Lösung

15 mg ml<sup>-1</sup> Agarose 1,5 g  
TAE-Puffer, pH 7,5-8,0 100 ml

## 2.4. Antikörper und Seren

Biotinylated anti Rabbit IgG, Art. Nr.: vcba1000-mc15 Fa. VECTOR

Biotinylated anti-Mouse IgG1, Art. Nr.: BA-2001 Fa. VECTOR

Kaninchen anti human von Willebrand- Faktor, Art. Nr.: A0082 Fa. DAKO

Kaninchen IgG Negativkontrolle, Art. Nr.: X0903 Fa. DAKO

M-38 Maus IgG, Mayo Clinic Scottsdale, 13400 East Shea Blvd., Scottsdale, AZ 85259

Maus anti CD11b IgG, Art. Nr.: SM440 Fa. DPC BIERMANN

Maus IgG1 Negativkontrolle, Art. Nr.: X 0931 Fa. DAKO

Maus monoklonal anti Desmin IgG, Klon DE-U-10, Art. Nr. : D1033 Fa. SIGMA

Maus monoklonal anti Vimentin IgG, Klon Vim 3B4, Art. Nr.: M7020 Fa. DAKO

normales Pferdeserum, Art. Nr.: S2000 Fa. VECTOR

normales Schafserum, Art. Nr.: X0503 Fa. DAKO

*Ulex europaeus* Lektin (UEAI), Art. Nr.: L9006- 1mg Fa. SIGMA

## 2.5. Verbrauchsmaterialien

15 ml Röhrchen, Art. Nr.: 352097 Fa. BECTON DICKINSON

50 ml Röhrchen, Art. Nr.: 352070 Fa. BECTON DICKINSON

Aluminiumfolie, Fa. HLL

Disposable Cytofunnels™, Art. Nr.: 50410040 Fa. SHANDONn

Einmalspritzen 20 ml, Art. Nr.: 4606205V Fa. BRAUN

Einmalspritzen 5 ml, Art. Nr.: 4606051V Fa. BRAUN

Einwegskalpelle DIM21, Art. Nr.: 5518075 Fa. BRAUN-AESCLAP

Faltenfilter, Art. Nr.: 250206503 Fa. HLL

Kanülen (gelb): Ø 0,90 x 40 mm/ 20 G x 1,5, Art. Nr.: 4657519 Fa. BRAUN

Kanülen (grün): Ø 0,80 x 120 mm/ 21 G x 4,75, Art. Nr.: 4665643 Fa. BRAUN

Kryo- Röhrchen 1,8 ml, Art. Nr.: 377267 Fa. NUNC

Nahtmaterial Mersilene 5/0, Fa. ETHICON

Nahtmaterial Prolene 5/0, Art. Nr.: EH7477H Fa. ETHICON

Nahtmaterial Vicryl 2-0, Fa. ETHICON

Objektträger, Art. Nr.: 1473870 Fa. HLL

OP-Abdecktücher, Art. Nr.: 800330-42 Fa. MÖLNLYCKE

Petrischalen (Gewebekulturschalen) 60 x 15 mm, Art. Nr.: 353004 Fa. BECTON DICKINSON

Präparatemappen Münchener Modell

Reaktionsgefäße 1,5 ml, Art. Nr.: 30120.086 Fa. EPPENDORF

Reaktionsgefäße 2,5 ml, Art. Nr.: 30120.094 Fa. EPPENDORF

Serologische Pipetten 10 ml, Art. Nr.: 357551 Fa. BECTON DICKINSON

Serologische Pipetten 25 ml, Art. Nr.: 357525 Fa. BECTON DICKINSON

Spritzen 20 ml, Art. Nr.: 4606205V Fa. BRAUN

Spritzen 5 ml, Art. Nr.: 4606051 Fa. BRAUN

Spritzenfilter 0,2 µ, Art. Nr.: 190-2520 Fa. NUNC

Sprühverband (Aluminium-Spray), Fa. A. ALBRECHT

Zellkulturflaschen 25 cm<sup>2</sup>, Art. Nr.: 156367 Fa. NUNC

Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup>, Art. Nr.: 156499 Fa. NUNC

---

## 2.6. Geräte

CO<sub>2</sub> Inkubator 195 l Volumen IncuSafe, mit Integration von Schlauchdurchführungen im Türbereich, Art. Nr.: MCO20AIC Fa. HLL

Eismaschine ZBE 70-35, Art. Nr.: 416607035 Fa. HLL

Elektronische Analysenwaage GENIUS ME, Art. Nr.: ME215POCE Fa. HLL

Elektronische Präzisionswaage Sartorius MasterPro, Art. Nr.: LP22000POCE Fa. HLL

Elektrophoresekammer Sob Cell GT Fa. BIORAD

Fluoreszenzeinrichtung für CK 40 Fa. OLYMPUS

Geldokumentationssystem E.A.S.Y. 429 K Fa. HEROLAB

Gießkassette Fa. BIORAD

Inverses Labormikroskop CK 40 Hellfeld, Fa. OLYMPUS

Kryostat HM 560 M Cryo-Star, Art. Nr.: 956060 Fa. MICROM

Laminar-Flow-Werkbank HSP15 Fa. HERAEUS/KENDRO

Magnetrührer MONO, Art. Nr.: 517930155 Fa. HLL

Mehrkanalpumpe IP-8, Art. Nr.: ISM941 Fa. HLL

Mikro- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße, Art. Nr.: 550131820 Fa. HLL

Multifuge 3S-R , Art. Nr.: 75004371 Fa. HLL

Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container, Art. Nr.: 5100-0001 Fa. NALGENE

Netzgerät Power Pac 300 Fa. BIORAD

Olympus Digitalkamera DP 50 mit Bildarchivierungssystem, Art. Nr.: 034360 Fa. OLYMPUS

pH- Meter Typ 766-SETB, Art. Nr.: 9774763 Fa. OMNILAB

Photometer, Spectronic 1201 Fa. MILTON RAY

### **Pipetten:**

Pipettierhilfe „Easypet“ 4420, Art. Nr.: 4420000010 Fa. HLL

Eppendorf Research 0,5 – 10 µl, Art. Nr.: 112185136 Fa. EPPENDORF

Eppendorf Research 10 – 100 µl, Art. Nr.: 3111000025 Fa.: EPPENDORF

Eppendorf Research 100 – 1000 µl, Art. Nr.: 3111000068 Fa.: EPPENDORF

Eppendorf Research 20 – 200 µl, Art. Nr.: 3111000041 Fa.: EPPENDORF

Pumpe IPC, 8 Kanal Fa. ISMATEC

Pumpenschlauch Pharmed<sup>®</sup> Art. Nr.: 0539-18 Fi/SC 0353 Fa. ISMATEC

Rollerflascheneinrichtung einlagig, Steuerung extern, Art. Nr.: 76001065 Fa. HLL

Rotationsapparat für den Inkubator Fa. HERAEUS/KENDRO

Schlauchverbinder-Reduzierstücke 4,0 – 6,0, Art. Nr.: ISM 573 Fa. ISMATEC

Schüttelwasserbad 1083, Art. Nr.: 418800011 Fa. HLL

Schüttler Vibrax VXR, Art. Nr.: 9729900 Fa. OMNILAB

Servo Ventilator 900C, Fa. SIEMENS

Silikonperoxid-Schlauch, Art. Nr.: MF 0045 Fa. ISMATEC

Swagelok<sup>®</sup> Schlauchkupplung QB4 Fa. BEST VENTIL + FITTING

System- Mikroskop BX 41 Hellfeld Phasenkontrast Fluoreszenz, Fa. OILYMPUS

Tiefkühlschrank GFL –85°C, Art. Nr. 8485 Fa. GFL

Ultratiefkühltruhe –152°C 128 l, Art. Nr.: MDF1155ATN Fa. HLL

Universal- Wärmeschrank ULE 500, Art. Nr.: 412634501 Fa. HLL

Universal- Wärmeschrank ULE 600, Art. Nr.: 412634601 Fa. HLL

Vertikaler Standautoklav Typ 5075 ELV, Art. Nr.: 9032 Fa. SYSTEC

Zählkammer nach Neubauer Fa. OMNILAB

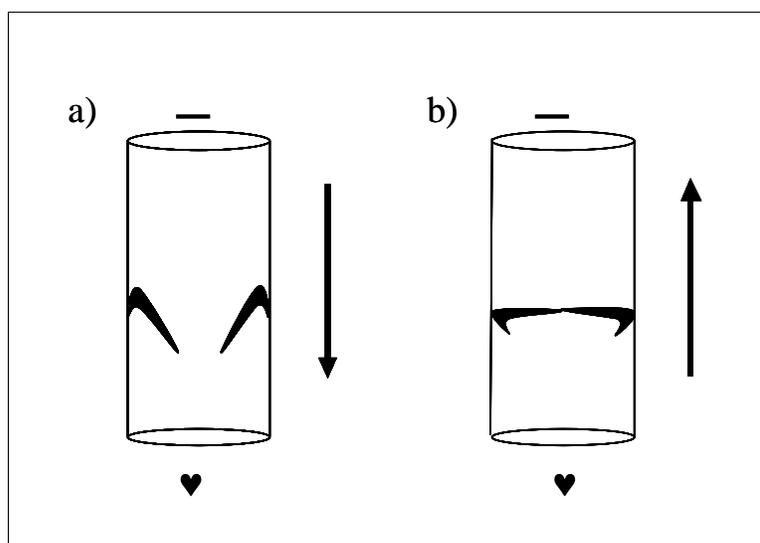
Zentrifuge Z 383 K, Art. Nr.: 270.00 V07 Fa. HERMLE LABORTECHNIK

Zytozentrifuge Zytofuge, Cytospin 2, Fa. SHANDON

### 3. METHODEN

#### 3.1. Identifikation einer Venenklappe

Nach Entnahme der *Venae jugularis externa* von männlichen Schwarzkopfschafen wurden die Venensegmente mehrfach mit phosphatgepufferter Salinelösung (PBS) gewaschen. Blutreste von der Explantation wurden dadurch entfernt. Um sowohl das Vorhandensein von Venenklappen als auch die Ausrichtung der Klappensegel festzustellen, wurde in beide Öffnungen der Vene mit Hilfe einer 5ml Pipette nacheinander PBS eingefüllt. Bei Vorhandensein einer Klappe wird bei dem Befüllen von einer Seite die Flüssigkeit durch die geschlossenen Segel zurückgehalten. In diese Seite wurde ein Bändchen eingenäht, es markiert in allen folgenden Schritten die proximale, also die „Herzseite“ der Vene. Die entsprechende Gegenseite, bei der bei Befüllung sich die Klappensegel öffnen, wird im folgenden Verlauf als „Kopf“ oder distale Seite bezeichnet (s. Abb 5).



**Abb. 5:** Schema der Venenklappenphysiologie (Jugularvene).

- a) Das Blut wird vom Kopf (—) zum Herzen (©) weitergeleitet: Die Venenklappe ist geöffnet.  
 b) Beim Senken des Kopfes sackt das Blut zurück in Richtung Kopf: Die Segel der Venenklappe schließen sich.

#### 3.2. Dezellularisierungsprozess

Zur Herstellung eines empfängerspezifischen Transplantats und zur Vermeidung einer immunologischen Abstoßungsreaktion des Empfängers, ist es notwendig, vor einer Rebesiedlung alle Zellen des Matrix-Spenders zu entfernen. Verbleiben einige Zellen oder

Zelldegradationsprodukte des Matrix-Spenders in der Gerüststruktur können diese, bei späterer Implantation, Orte einer Mineralisierung, also Verkalkung werden (Maxwell et al., 1989).

Um das Venensegment für eine autologe Neubesiedlung mit vaskulären Zellen eines weiblichen Empfängertieres vorzubereiten, mussten die ursprünglichen Zellen des männlichen Matrixspenders entfernt werden. Dieser Prozess wird im weiteren Verlauf als „Dezellularisierung“, dezellularisierte Segmente als „azellulär“ bezeichnet. Für eine vollständige Entfernung der Zellen wurden zunächst die folgenden fünf

Dezellularisierungsmethoden getestet:

1. Dezellularisierung mit Trypsin/ EDTA
2. Dezellularisierung mit zwei unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen
3. Dezellularisierung mit Aqua dest.
4. Dezellularisierung nach Meezan
5. Dezellularisierung modifiziert nach Meezan mit Natriumdesoxycholat

### **3.2.1. Dezellularisierung mit Trypsin/ EDTA**

Zur Dezellularisierung von porcinen Blutgefäßen und Herzklappen wurde in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO, Medizinische Hochschule Hannover) ein Arbeitsprotokoll auf Basis der Trypsin-Verdauung entwickelt, welches die extrazelluläre Matrix im Falle der Herzklappen bestmöglich erhält und das Gewebe vollständig von Zellen befreit (Steinhoff et al., 2000). Zur Überprüfung der Übertragbarkeit dieser Methode wurde sie an ovinen Jugularvenen getestet.

Die sowohl für die Zellkultur als auch für die Dezellularisierung verwendete Trypsin/ EDTA-Lösung lag als Konzentrat vor. Die sterilfiltrierte Enzymlösung (0,05 % [M/V] Trypsin und 0,02 % [M/V] EDTA in PBS) wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und direkt nach dem Auftauen bei  $37^{\circ}\text{C}$  zur Dezellularisierung eingesetzt, um eine Selbstverdauung des Trypsins zu vermeiden. Die Venensegmente wurden für 24 Stunden mit der Enzymlösung in einem 50 ml Röhrchen, wobei die Vene vollständig mit der Lösung bedeckt war, im Schüttelwasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  angedaut. Anschließend wurde die Lösung gegen PBS ausgetauscht und es wurde für weitere 24 Stunden im Schüttelwasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. In dieser Phase sollten die durch das Trypsin angedauten Zellverbindungen gelockert und die losgelösten Zellen aus dem Gewebe ausgeschüttelt werden. Es schloss sich direkt danach ein erneuter Zyklus mit Trypsin/EDTA und PBS für jeweils 24 Stunden im Schüttelwasserbad an. Nach Beenden der

---

Dezellularisierung wurden Teile der Venenwand und der Klappenregion bis zur histologischen Untersuchung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.2.2. Dezellularisierung mit zwei unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen (A + B Methode)**

Diese Methode beruht auf zwei unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen und wurde ebenfalls im LEBAO von H. Mertsching und O. Brenning entwickelt (2001, zum Patent angemeldet) und für die Dezellularisierung von porcinem Dünndarmgewebe (SIS = small intestine submucosa) etabliert.

Bei dieser Methode wurden folgende Salzlösungen verwendet:

#### Lösung A (0,56 % NaCl; pH 7,3):

96 mM NaCl

27 mM NaCitrat

5,6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

1,5 mM KCL

#### Lösung B (0,8% NaCl; pH 7,4):

137 mM NaCl

8,2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

3,2 mM KCL

1,5 mM EDTA

Für die Dezellularisierung wurden die Venensegmente intraluminal von der „Kopfseite“ her mit Lösung A (mit 0,56% NaCl) prall gefüllt. Mit Bulldogklemmen wurden die Segmente jeweils an beiden Enden abgeklemmt und in 50 ml Röhrchen mit 1,32 %iger [M/V] NaCl gelegt. Die Röhrchen wurden für 20 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Durch die beiden unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen entsteht in der Venenwand ein Gradient, der die Zellen aus ihrem Verband herauslösen soll. Anschließend wurden die Venensegmente dreimal mit PBS gespült, dann mit Lösung B (mit 0,8% NaCl) befüllt und erneut mit Bulldogklemmen verschlossen. Sie wurden wiederum in 1,32 %iger [M/V] NaCl-Lösung gelegt und für weitere 20 Minuten im Schüttelwasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Der Versuch wurde mit verlängerten Inkubationszeiten (40 Minuten, 60 Minuten und 90 Minuten) für

Lösung A und B mit weiteren Venensegmenten wiederholt. Danach wurden die Segmente erneut dreimal mit PBS gespült und für weitere histologische Untersuchungen Teile der Venenwand und der Klappenstrukturen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.2.3. Dezellularisierung mit Aqua dest.**

Durch osmotische Prozesse sollten die Zellen in der extrazellulären Matrix der klappentragenden Venensegmente zum Platzen gebracht werden. Ichikawa und Mitarbeiter (1994) verwendeten bovine Venensegmente als Ersatz für die rechte, ventrikuläre Pulmonalarterie. Hierfür dezellularisierten sie die Venen mit Aqua dest. Auch Parnigotto und Mitarbeiter (2000) inkubierten Kaninchen-Aorta zunächst in Aqua dest., bevor sich der eigentliche Dezellularisierungsprozess anschloss.

Für die vorliegende Arbeit wurden die ovinen klappentragenden Venensegmente nach Spülen in PBS für 18 Stunden in sterilem Aqua dest. unter Schütteln inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch zweistündige Behandlung mit 1 molarer Natriumchlorid-DNase Typ I-Lösung (2000 KU DNase) bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Schüttelwasserbad abgedaut. Stücke der dezellularisierten Venensegmente wurden in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und bis zur histologischen Untersuchung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.2.4. Dezellularisierung nach Meezan**

Eine von Meezan und Mitarbeiter (1975) beschriebene Dezellularisierungsmethode wurde für verschiedene Gewebe zur chemischen Isolation der Basalmembran entwickelt. Sie beruht auf einer Inkubation des Gewebes in einer Natriumdesoxycholat-Natriumazid-Lösung und fand in Variationen bereits Anwendung zur Dezellularisierung von Aorten (Parnigotto et al., 2000), Herzklappen (Laube und Matthäus, 2001) und Kaninchenharnleitern (Sievert und Tanagho, 2000). Diese Methode wurde ebenfalls an klappentragenden Venensegmenten getestet.

Für die Dezellularisierung wurden die Venensegmente zunächst zur partiellen Zellyse in 20 ml einer 1 % [M/V] Natriumazid-Lösung bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 2 Stunden unter Schütteln inkubiert. Zur vollständigen Zellyse und dem Verdau der DNA wurden die Segmente in 20 ml einer 1 molaren Natriumchlorid-DNase Typ I-Lösung (2000 KU DNase) überführt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 2 Stunden im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Lyse der Lipidmembran der Zellen wurden die Venensegmente anschließend in 20 ml einer 4 % [M/V] Natriumdesoxycholat-0,1 % [M/V]-Natriumazid-Lösung bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 Stunden inkubiert. Dieser Membranlyse Schritt wurde nach Erneuern der Lösung ein weiteres Mal bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 Stunden durchgeführt.

Reinigung der Venensegmente von sämtlichen Rückständen der Dezellularisierungslösungen schlossen sich drei Waschschriffe mit PBS bei jeweils 37°C für 12 Stunden im Schüttelwasserbad an. Das dezellularisierte Gewebe wurde zur weiteren histologischen Untersuchung im flüssigen Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

### **3.2.5. Dezellularisierung modifiziert nach Meezan mit Natriumdesoxycholat**

Die Dezellularisierungsmethode nach Meezan wurde im weiteren Verlauf an den Arbeiten mit den klappentragenden Venensegmenten soweit verkürzt, bis nur noch die 4 %ige [M/V] Natriumdesoxycholat- und 1 %ige [M/V] Natriumazid-Lösung eingesetzt wurden. Natriumdesoxycholat gehört zu der Gruppe der Gallensäuren und führt bei Behandlung von Zellen über Induktion von Apoptose zum Zelltod (Strupp et al., 2000).

Für die Dezellularisierung wurden klappentragende Venensegmente luminal mit der Natriumdesoxycholat/ Natriumazid-Lösung befüllt, und mit Bulldogklemmen an der Kopf- und an der Herzseite verschlossen. Natriumazid wirkt hochgradig zelltoxisch, daher wurden parallel Venensegmente in einer Natriumdesoxycholat-Lösung ohne Natriumazid dezellularisiert. Sie wurden in 50 ml Röhrchen überführt und mit Natriumdesoxycholat/ Natriumazid-Lösung vollständig bedeckt. Die Segmente wurden dann bei 4°C für unterschiedliche Zeiten geschüttelt: 10 min, 30 min, 60 min und 90 min. Anschließend wurden die Matrices für 18 Stunden in PBS geschüttelt und dann erneut von innen und außen mit PBS gespült. Teile der Venenwand und der Klappenstrukturen wurden herausgeschnitten und für die Beurteilung der Dezellularisierung in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80 °C gelagert.

## **3.3. Nachweis der Dezellularisierung**

### **3.3.1. Beschichten von Objektträgern mit 3-Aminopropyltriethoxy-silan (Silan)**

Zur Fixierung von Gefrierschnitten für histologische Färbungen auf Objektträgern wurden die Objektträger vor der Anfertigung der Gefrierschnitte mit Silan beschichtet. Um die Glasoberflächen vollständig von Fett zu befreien, wurden die Objektträger für 5 Minuten in Aceton getaucht. Anschließend wurden sie in ein vorbereitetes Bad aus Aceton mit 2 % [V/V] Silan getaucht. Nach weiteren 5 Minuten wurden die Objektträger aus der Lösung entnommen, 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert, kurz mit Aqua dest. abgespült und über Nacht bei 60°C getrocknet.

### 3.3.2. Anfertigen von Gefrierschnitten

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die gefrorenen Gewebeproben in ein Gefriermikrotom (s. Kap. 2.6.) überführt und dort bei  $-23^{\circ}\text{C}$  Kammertemperatur und  $-21^{\circ}\text{C}$  Objektstichtaltertemperatur mindestens 15 min temperiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Gewebeprobe auf dem Objektsticht in der gewünschten Position, mit dem bei Raumtemperatur flüssigem Einbettungsmedium (Tissue Tek<sup>®</sup>), welches in der kalten Kammer aushärtete. Zum Herstellen einer glatten Schnittoberfläche wurden zunächst einige Trimm-Schnitte von 50  $\mu\text{m}$  Dicke angeschnitten. Danach wurden die eigentlichen Feinschnitte mit 6  $\mu\text{m}$  Schnittdicke angefertigt und auf silanisierte Objektträger übertragen. Anschließend wurden die Präparate für mindestens 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann bis zur späteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.3.3. Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbung (H&E-Färbung)

Durch die H&E-Färbung werden Zellkerne (blau) und extrazelluläre Matrix (rosa) unterschiedlich angefärbt. In der späteren mikroskopischen Auswertung kann beurteilt werden, ob und wie viele Zellen noch in der Venenwand oder in den Klappensegeln vorhanden sind.

Die Fixierung der Gefrierschnitte auf den Objektträgern erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 8 min in Aceton mit anschließender Lufttrocknung für 10 bis 30 min bei Raumtemperatur. Zur Rehydrierung wurden die Präparate kurz in Aqua dest. eingetaucht. Anschließend erfolgte eine Färbung der Zellkerne durch Inkubation für 8 Minuten in einer frisch gefilterten Hämalaunlösung nach Mayer. Dieser basische Farbstoff färbt die Zellkerne blau an, 10 min Nachbläuen unter fließendem Leitungswasser schloss diesen Färbungsschritt ab. Anschließend wurde durch 5 min Inkubation der Präparate in saurer 0,1 % [M/V] Eosin-Lösung sowohl das Zytoplasma als auch die extrazelluläre Matrix rosa angefärbt. Nach kurzem Eintauchen der Objektträger in Aqua dest. wurden die Schnitte zur Differenzierung in 80 % [V/V] Ethanol gestellt. Zur Entwässerung der Schnitte durchliefen die Präparate eine aufsteigende Alkoholreihe. Diese bestand aus drei unterschiedlich konzentrierten Ethanolösungen von 90 % [V/V], 96 % [V/V] und 100 %. In dieser Abfolge wurden die Präparate jeweils 2 min pro Lösung inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger nacheinander für jeweils 5 min in Xylol getaucht und mit dem Eindeckmittel (Corbit Balsam) und einem Deckgläschen versiegelt.

### 3.3.4. Bestimmung des DNA- Gehaltes

Mit den verbliebenen Geweberesten der Präparate, die in der H&E-Färbung keine Zellkerne mehr aufwiesen, wurde zusätzlich noch eine Bestimmung des Rest-DNA-Gehaltes durchgeführt.

Aus den dezellularisierten Geweben wurde die verbliebene DNA isoliert und aufgereinigt. Anhand nativer Kontrollen (native ovine Vene) konnte die Reduktion von DNA in den dezellularisierten Geweben semiquantitativ bestimmt werden.

Sowohl native als auch dezellularisierte Venensegmente wurden in tiefgefrorenem Zustand mit einem Skalpell zerschnitten und als kleine Fragmente von ca. 2-4 cm<sup>3</sup> auf der Analysenwaage gewogen. Die Fragmente wurden erneut mit dem Skalpell zerkleinert und in ein Ribolyser-Tube (s. Kap. 2.5.) mit 500 µl DMEM- Medium überführt. Im Ribolyser (s. Kap. 2.6.) wurden die Proben 2-3 x bei Einstellung 4000 für jeweils 20 Sekunden lysiert und anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu jeder Probe wurden 750 µl Tri-Reagent gegeben. Nach 15 min wurden jeweils 200 µl Chloroform zupipettiert, um die wässrige Phase zu vergrößern und um die DNA besser zu lösen. Die Röhrcchen wurden sofort vorsichtig über Kopf geschüttelt. Zur Trennung der Phasen wurden die Proben für 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 11300 rpm zentrifugiert. Es wurden nun drei Phasen sichtbar: eine untere Phase (rosa), bestehend aus Phenol und Proteinen, eine mittlere Phase, bestehend aus DNA und eine obere, wässrige Phase, die überwiegend aus RNS bestand. Die mittlere und obere Phase wurden vorsichtig abgenommen, ihnen wurden 300 µl 100 %iges Ethanol zugegeben und kurz gemischt. Die Proben blieben 2-3 Minuten bei Raumtemperatur stehen und wurden danach bei 4°C und 12500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das verbleibende Pellet mit 1000 µl 0,1 M Natriumcitrat mit 10 % [V/V] Ethanol aufgenommen (1. Waschschrift). Die Proben wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 15 Minuten bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Pellet in 1000 µl 0,1 M Natriumcitrat mit 10 % [V/V] Ethanol aufgenommen (2. Waschschrift). Für 10 bis 15 Minuten wurden die Proben nun bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 1000 µl 75 %igen [V/V] Ethanol aufgenommen und für weitere 10 bis 20 Minuten inkubiert. Bei 4°C und 12000 rpm wurden die Proben im Anschluss zentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal dekantiert und die restliche Flüssigkeit vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen. Mit geöffneten Deckeln wurden die Röhrcchen zum Trocknen in den Abzug gestellt. Das Pellet wurde dann in

50 µl Aqua dest. (autoklaviert) aufgenommen und kurz aufgeschüttelt. Für die Messung der optischen Dichte am Photometer wurden 5 µl der Probe entnommen und mit 195 µl Aqua dest. verdünnt. Bei 260 nm wurden die Proben gegen einen Leerwert (Aqua dest.) gemessen.

### **3.3.5. Gelelektrophorese der isolierten DNA**

Mit der Agarosegelelektrophorese ist es möglich, vorhandene DNA-Fragmente unter UV-Licht in einem Agarosegel sichtbar zu machen. Die DNA wandert unter der Anlegung eines elektrischen Feldes durch das Agarosegel und wird dabei von seinem Fließmittel Bromphenolblau getrennt. Dieser Nachweis wurde zur Unterstützung der photometrischen DNA-Konzentrationsbestimmung der nativen und azellulären Proben eingesetzt. Zur Herstellung des Agarosegels wurde eine 1,5 % [M/V] Agarose-Lösung in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nach Abkühlung der Agarose-Lösung auf 50°C wurde sie mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA-Moleküle ein und führt so zu einer intensiven orangen Fluoreszenz der DNA im UV-Licht. Das Gel wurde nun in eine horizontale Gießkammer mit eingehängtem Probenkamm gegossen. Durch ca. 20 min Abkühlen bei Raumtemperatur erstarrte das Gel. Der Probenkamm wurde nun vorsichtig entfernt und das Gel in die mit TAE-Puffer (s. Kap. 2.3.1.) gefüllte Elektrophoresekammer überführt. 10 µl der zu untersuchenden Proben wurden mit je 3 µl Bromphenolblau-Lösung versetzt und je 10 µl dieser Lösung in die vorgesehenen Taschen des Gels pipettiert. An die Elektrophoresekammer wurde ein elektrisches Feld solange angelegt, bis die Bromphenolblau-Front fast das gesamte Gel durchlaufen hat. Abschließend wurde das Agarosegel auf einen UV-Leuchttisch überführt und zur Dokumentation fotografiert.

## **3.4. Isolation, Vermehrung und Kultur autologer primärer vaskulärer Zellen**

### **3.4.1. Beschichtung von Zellkulturflaschen mit Gelatine**

Vor der Isolierung von Endothelzellen aus einem Gefäß und für jede Passagierung mussten die Zellkulturgefäße zunächst mit einer 1 %igen [M/V] Gelatine-Lösung beschichtet werden. Zur Herstellung der 1 %igen [V/V] Gelatine-Lösung wurde Gelatine in Aqua dest. bei 60°C erwärmt, bis sie sich vollständig gelöst hat. Dann wurde die Lösung steril filtriert und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

Für die Beschichtung der Zellkulturflaschen wurde die Gelatinelösung im Wasserbad bei 37°C erwärmt und je nach Größe der Kulturflaschen 2-8 ml der Gelatinelösung in die Flaschen pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Gelatine-Lösung entfernt und die Flaschen zweimal mit PBS gespült.

#### **3.4.1.2. Isolation primärer Endothelzellen**

Aus der ovinen *Jugularis externa* des späteren Implantat- Empfängertieres wurden die Endothelzellen (EC) der *Tunica intima* enzymatisch entfernt, in Kultur gebracht und für eine spätere Rebesiedlung expandiert.

Zur Beseitigung von Blutbestandteilen wurde das Venensegment 3-5 mal mit PBS gespült. Hierbei musste auf die Spülrichtung geachtet werden, da der Fluss in den Gefäßen aufgrund der Venenklappen nur in die Richtung zum Herzen hin möglich ist.

Falls das Gefäß eine Venenklappe besaß, wurde zuerst die „Herzseite“ mit einer Bulldogklemme verschlossen. Über eine 10 ml Spritze wurde von der „Kopfseite“ des Gefäßes her eine 0,2 %ige [M/V] Kollagenase-Lösung eingefüllt, und das Gefäß anschließend mit einer zweiten Bulldogklemme ebenfalls abgeklemmt. Die Vene wurde vorsichtig in ein 50 ml Röhrchen gelegt und vollständig mit PBS bedeckt. Bei 37°C wurde für 30 Minuten inkubiert. Die Klemmen an beiden Enden der Vene wurden geöffnet und die Enzym-Lösung mit den abgelösten Zellen in ein 50 ml Röhrchen abgelassen. Das Lumen wurde mit 20ml DMEM-Medium, supplementiert mit 15 % [V/V] fötalem Kälberserum (FCS), mit Spritze und Kanüle unter kräftigem Druck von der „Kopfseite“ her durchgespült. Das FCS im Medium ist für die Inaktivierung der Kollagenase notwendig, da eine zu lange Inkubation die Zellen schädigt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde in 5 ml Endothelzell-Kulturmedium (s. Kap. 2.3.) resuspendiert und in eine mit Gelatine beschichtete 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät.

#### **3.4.1.3. Kultivierung von Endothelzellen**

Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Bei Konfluenz wurden die EC zunächst auf eine jeweils mit Gelatine beschichtete 75 cm<sup>2</sup> und später 175 cm<sup>2</sup> Kulturflasche passagiert. Waren die Zellen auch in den großen (175 cm<sup>2</sup>) Flaschen konfluent, wurde der zelluläre Inhalt einer Flasche auf jeweils zwei neue, mit Gelatine beschichtete Kulturflaschen verteilt. Wöchentlich wurden die Endothelzellkulturen zweimal mit frischem EC-Medium versorgt, wobei immer die Hälfte des verbrauchten Mediums verworfen wurde.

### **3.4.2. Isolation glatter Muskelzellen und Fibroblasten durch Auswachsen**

Von der nun von Endothelzellen befreiten Vene wurde die *Tunica adventitia*, die äußere Bindegewebsschicht, mit einem Skalpell abgetrennt, jedoch nicht vollständig entfernt. Es handelte sich deshalb bei den zu isolierenden Zellen um Kokulturen aus glatten Muskelzellen (SMC) und Fibroblasten (Fb), die zusammengefasst wurden als Myofibroblasten (MFb). Zur Isolierung wurde die Vene zunächst in ca. 1 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und in eine Gewebekulturschale gebracht. Für einige Minuten wurden die Kulturgefäße bei geöffnetem Deckel stehen gelassen, um den Fragmenten die Möglichkeit zu geben, am Boden zu adhären. Dabei durften die Venenstücke aber nicht vollständig austrocknen, um ein Absterben der Zellen zu verhindern. Dann wurden 4 ml Myofibroblasten-Kulturmedium (s. Kap. 2.3.) vorsichtig hinzupipettiert, so dass die Venenstückchen vollständig bedeckt waren, aber nicht aufschwammen.

#### **3.4.2.1. Kultivierung von Myofibroblasten (MFb)**

Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Ein erstes Auswachsen der Zellen wurde nach spätestens 5 Tagen unter dem Zellmikroskop beobachtet. Bei Konfluenz der Zellen wurde zunächst auf eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche und später auf eine 175 cm<sup>2</sup> Kulturflasche passagiert. Waren auch in diesen großen Flaschen die MFb konfluent auf der gesamten Fläche verteilt, wurde eine Kulturflasche auf zwei neue aufgeteilt. Wöchentlich wurden die MFb-Kulturen zweimal mit frischem MFb-Medium versorgt, wobei auch immer die Hälfte des vorherigen Mediums verworfen wurde.

#### **3.4.3. Lichtmikroskopische Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils 20 µl der Zellsuspension abgenommen und in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit Trypanblau-Lösung versetzt. Trypanblau dringt durch die geschädigte Plasmamembran toter Zellen ein, d.h. es färbt Kern und Zytoplasma toter Zellen blau an. Die Suspensionen wurden in eine Zählkammer nach Neubauer gegeben. Im Durchlichtmikroskop wurde die Anzahl vitaler Zellen bei 400-facher Vergrößerung bestimmt. Über Zugabe definierter Volumina von Zellkulturmedien wurde anschließend die gewünschte Zellzahl für weitere Versuche eingestellt.

#### **3.4.4. Ablösen von Zellen mit Trypsin/ EDTA**

Zum Ablösen von Zellen aus einem Kulturgefäß wurde zunächst das Kultivierungsmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um Zelltrümmer und Medienrückstände zu entfernen. Jeweils nach Größe der Kulturflaschen wurden 2 bis 4 ml Trypsin/ EDTA-Lösung (s. Kap. 2.3.) auf die Zellen pipettiert, und durch vorsichtiges Schwenken der Kulturflasche gleichmäßig verteilt. Die Zellen mit der Enzymlösung wurden 2-5 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich sämtliche Zellen vom Kulturflaschenboden abgelöst hatten. Die Kontrolle hierfür erfolgte am Zellmikroskop. Das Abstoppen der Trypsinreaktion wurde durch Zugabe des dreifachen Volumens an DMEM-Medium supplementiert mit 15 % FCS erreicht. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in Zellkulturmedium resuspendiert.

#### **3.4.5. Charakterisierung der Zellen**

Um festzustellen, ob es sich bei den kultivierten Zellen um die gewünschten Populationen handelte, wurden die EC und MFb vor der Rebesiedlung immunhistochemisch charakterisiert. Dafür mussten die Zellen auf einen silanisierten Objektträger gebracht werden.

#### **3.4.6. Anfertigen von Zytospots**

Unter einem Zytospot versteht man die Herstellung von auf Objektträgern zentrifugierten Zellen, um sie immunhistochemisch oder molekularbiologisch zu charakterisieren. Hierzu wurden die zur Färbung vorgesehenen Zellen nach der Zentrifugation in PBS anstelle von Kultivierungsmedium, resuspendiert, da die Mediumbestandteile die Immunreaktion während der Färbung stören können. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und auf eine Konzentration von  $1,5 \times 10^5$  bis  $1,8 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter eingestellt. Durch die Einhaltung der angegebenen Zellkonzentrationen wurde gewährleistet, dass bei Auswertung der Färbung alle Zellen auf dem Objektträger einzeln zu erkennen waren. Zur Vorbereitung der Zentrifugation wurden die silanisierten Objektträger mit einem Filterpapier und einer Probenkammer („Disposable Zyto Funnels“, s. Kap. 2.5.) in einen Probenhalter eingespannt und die gesamte Vorrichtung in eine Zytocentrifuge (s. Kap. 2.6.) gehängt. In die Probenkammer wurden 200 µl der Zellsuspension pipettiert und die Zytocentrifuge bei 600 rpm für 7 min betrieben. Abschließend trockneten die Präparate 30 Minuten bis 24 Stunden

bei Raumtemperatur. Bis zur immunhistochemischen Untersuchung wurden die Proben bei – 80°C gelagert.

### **3.5. Rebesiedlung**

#### **3.5.1. Optimierung der Zellzahl**

Um die geeignete Zellmenge von Endothelzellen und Myofibroblasten zu ermitteln, die für eine dreidimensionalen Besiedlung von klappentragenden Venensegmenten im Bioreaktor notwendig waren, wurde zunächst die Rebesiedlung in einer 24-well-Platte mit verschiedenen Zellzahlen im zweidimensionalen Modell untersucht. Hierfür fertigten die Forschungswerkstätten der Medizinischen Hochschule Hannover eine runde Metallstanze mit einem Durchmesser von 1,4 cm an, entsprechend der Vertiefung einer 24-well-Platte. Zuvor dezellularisierte Venensegmente wurden der Länge nach aufgeschnitten und über ihre gesamte Fläche ausgebreitet. Mit der Stanze wurden mehrere Stückchen herausgetrennt und vorsichtig in die Vertiefungen der 24-well-Platte gelegt: Für eine Besiedlung mit Endothelzellen mit der luminalen Oberfläche nach oben und für eine Besiedlung mit Myofibroblasten mit der luminalen Oberfläche nach unten.

Die Kreisfläche der zu besiedelnden Stückchen wurde berechnet nach:  $\pi \times r^2$

$$1 \text{ well } d = 1,4 \text{ cm}$$

$$r = d/2 = 0,7 \text{ cm}$$

$$\pi * 7^2 = 1,539 \text{ cm}^2$$

Die Fläche pro Vertiefung (pro zu besiedelnder Fläche) betrug 1,54 cm<sup>2</sup>.

Für eine spätere dreidimensionale Rebesiedlung eines vollständigen Venensegmentes wurde die zu besiedelnde Fläche ausgemessen und die Zellzahl rechnerisch angepasst.

##### **3.5.1.1. Zweidimensionale Besiedlung in einer Kulturplatte mit 24 Vertiefungen**

Ovine venöse Endothelzellen und Myofibroblasten wurden mit Trypsin/ EDTA (s. Kap. 2.3.) vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, bei 1200 rpm zentrifugiert und die Pellets in dem jeweiligen Zellkulturmedium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahlen in den Suspensionen (s. Kap. 3.4.3.) wurden die EC und MFB in einem definierten Volumen von 5 ml Kulturmedium in die Vertiefungen der Kulturplatte mit den zu besiedelnden Venenstückchen pipettiert. Es wurden hierfür verschieden konzentrierte Zellsuspensionen eingestellt (s. Tab. 2). Nach 1, 3, 5 und 10 Tagen wurde jeweils ein besiedeltes Venenstück

entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend Gefrierschnitte angefertigt. Anhand einer H&E-Färbung (s. Kap. 3.3.3.) wurde dann der Grad der Rebesiedlung beurteilt.

**Tabelle 2: Getestete Zelldichten in zweidimensionaler Rebesiedlung:**

Endothelzellen (in 5 ml)	Myofibroblasten (in 5 ml)
$1 \times 10^3$	$5 \times 10^3$
$5 \times 10^3$	$1 \times 10^4$
$1 \times 10^4$	$5 \times 10^4$
$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
$1 \times 10^5$	$5 \times 10^5$

### 3.5.2. Dreidimensionale Besiedlung im Bioreaktor

#### 3.5.2.1. Der Bioreaktor

Der für dieses Projekt verwendete Bioreaktor besteht aus einem Glaszylinder und wurde für die Rebesiedlung von porcinen Herzklappen in den Forschungswerkstätten der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt. Dieser Glaszylinder kann einseitig mit einem Schraubverschluss, in dem sich eine Gummidichtung befindet, verschlossen werden. Auf der anderen Seite befindet sich eine Lauffläche aus Kunststoff, die für die Rotation des Bioreaktors auf der Rollapparatur benötigt wird. An beiden Enden des Reaktors befinden sich mittig Schlauchanschlüsse mit Schnellverbindern für die Perfusion des Lumens. Zwei Hilfsanschlüsse erlauben die Perfusion des eingespannten Gefäßes. Im Inneren des Reaktors sind weitere zwei Distanzstäbe aus Glas angebracht, die mit dem Glasdeckel verbunden sind und zusätzlich der Stabilisierung des Einbaus dienen.

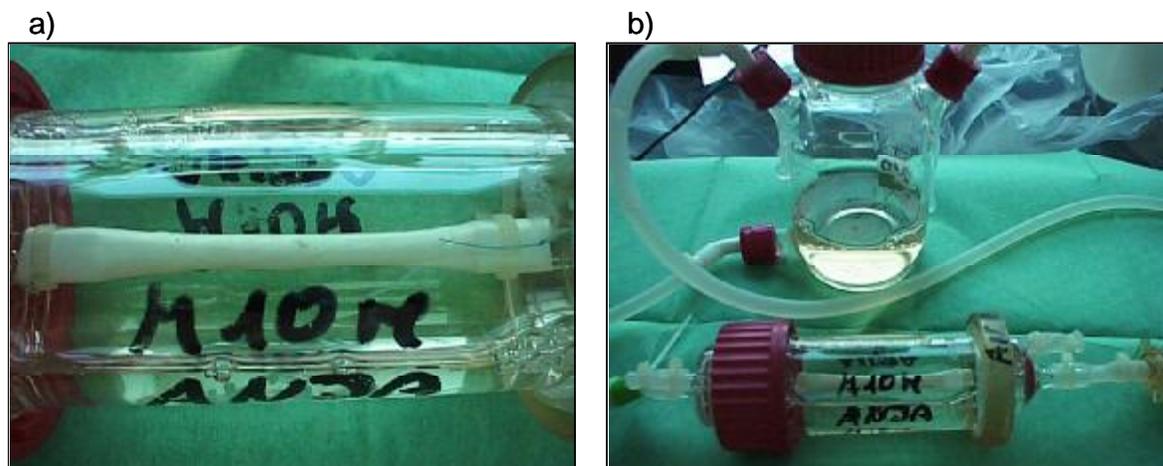
#### 3.5.2.2. Einspannen azellulärer Venensegmente in einen Bioreaktor

Dezellularisierte klappentragende Venensegmente von männlichen Matrix- Spenderschafen wurden unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank in die Bioreaktoren eingespannt. Hierfür wurde der Bioreaktor an der Verschraubung geöffnet und das Innenteil herausgenommen. Vorsichtig wurde erst die „Herzseite“ der azellulären Vene über den Glasstutzen der Deckelseite gezogen und sofort mit einem Kabelbinder fixiert. Anschließend wurde die „Kopfseite“ der Vene über den gegenüberliegenden Glasstutzen gezogen und

ebenfalls mit einem Kabelbinder befestigt. Der Außenzylinder des Bioreaktors wurde nun mit PBS gefüllt und das Innenteil vorsichtig hineingesteckt und der Schraubverschluß verschlossen (s. Abb. 6 a).

### 3.5.2.3. Anschluß der Perfusionsflaschen

Um die eingespannten Venen zu perfundieren, werden die Bioreaktoren über Silikonschläuche an den Hilfsanschlüssen mit einer 250 ml-Vorratsflasche mit drei Ansatzstücken verbunden. Die Lösung wird aus dem Vorratsbehälter in Bodenhöhe angesaugt, zirkuliert durch eine Pumpe in den Bioreaktor und fließt zurück in den oberen Teil der Flasche (s. Abb. 6 b). Das dritte Ansatzstück ist zur Belüftung mit einem Sterilfilter versehen. Vor der Besiedlung wurden die azellulären Venensegmente über mindestens 3 Tage mit PBS perfundiert, um Reste der Dezellularisierungslösungen restlos zu entfernen.



**Abb. 6:** Venenklappensegmente im Bioreaktor

a) Azelluläre klappentragende Jugularvene fertig eingespannt im Bioreaktor.

b) Zur Perfusion der Vene wurde der Bioreaktor über Schläuche an eine Versorgungsflasche mit PBS angeschlossen.

### 3.5.3. Rebesiedlung im Bioreaktor

Die im Bioreaktor eingespannten männlichen Spender- Matrices wurden mit weiblichen autologen Zellen rebesiedelt. Hierfür wurden Endothelzellen und Myofibroblasten mit Trypsin/ EDTA vom Boden der Kulturflaschen abgelöst (s. Kap. 3.4.4.), bei Raumtemperatur und 1200 rpm zentrifugiert und die Pellets in ihrem jeweiligen Kulturmedium aufgenommen.

Nach Zellzählung unter Verwendung von Trypanblau-Lösung in der Zählkammer nach Neubauer (s. Kap. 3.4.3.) wurde für die EC eine Zellzahl von  $1,2 \times 10^6$  und für die MFb eine Zellzahl von  $6 \times 10^6$  in jeweils einem Volumen von 2 ml eingestellt.

Die gesamte Dauer der Rebesiedlung und Kultivierung im Bioreaktor betrug 14 Tage.

### **3.5.3.1. Besiedlung mit Myofibroblasten**

Die Bioreaktoren wurden an der Verschraubung vorsichtig geöffnet und das PBS im Außenzylinder gegen MFb-Kulturmedium (s. Kap. 2.3.) ausgetauscht. Das Volumen betrug 70-80 ml. Bevor das Innenteil des Reaktors mit der eingespannten Matrix in den Außenzylinder zurückgeschoben wurde, wurde mit Hilfe einer 5 ml Pipette die MFb-Zellsuspension in das Kulturmedium pipettiert. Der Bioreaktor wurde fest verschlossen und bei 37°C über 40-48 Stunden auf der Rollapparatur (s. Kap. 2.6.) bei 0,1 rpm gerollt. Der beschriebene Vorgang der MFb-Aufgabe wurde wiederholt und der Reaktor im Anschluss erneut bei 37°C gerollt. Nach zwei Tagen wurde dieser Zyklus ein drittes Mal wiederholt. Es schloss sich die luminale EC-Besiedlung der Gefäßmatrices an.

### **3.5.3.2. Besiedlung mit Endothelzellen**

Sieben Tage nach der ersten Besiedlung mit Myofibroblasten begann die autologe Rebesiedlung der Matrices mit Endothelzellen. Hierfür wurde zunächst an der „Herzseite“ des Reaktors die Schnellkupplung des Hilfsanschlusses geöffnet und mit einer 5 ml Spritze und einer Kanüle die Pufferlösung (PBS) aus dem Lumen der Matrix entfernt. Anschließend wurde 1 ml der vorbereiteten EC-Zellsuspension ebenfalls über eine Kanüle in das Lumen der Vene gespritzt. Der Anschluss wurde verschlossen und der Bioreaktor gedreht. Nun wurde auf der „Kopfseite“ die Schnellkupplung des Hilfsanschlusses geöffnet und die verbleibende Zellsuspension über eine lange Kanüle in das Lumen, gegen die geschlossene Venenklappe gespritzt. Von beiden Seiten des Bioreaktors wurde nun mit EC-Kulturmedium das Lumen der klappentragenden Matrix bis zur vollständigen Füllung aufgefüllt. Nach Verschließen des Reaktors wurde dieser bei 37°C für 18 Stunden bei 0,1 rpm auf der Rollapparatur gerollt. Dann wurden die Bioreaktoren an die Versorgungsflaschen angeschlossen (s. Kap. 3.5.2.3.). Für eine optimale Versorgung der neu aufgesiedelten Endothelzellen wurden die Versorgungsflaschen mit 150 ml EC-Kulturmedium gefüllt. Über eine Pumpe, an der die Versorgungsschläuche befestigt wurden, wurde das Medium durch das Lumen der Matrix gepumpt. Die Förderleistung der Pumpe wurde zunächst sehr niedrig eingestellt (4,5 ml/min) und dann alle 60 Minuten hochreguliert, bis die endgültige Einstellung von 7 ml/min erreicht

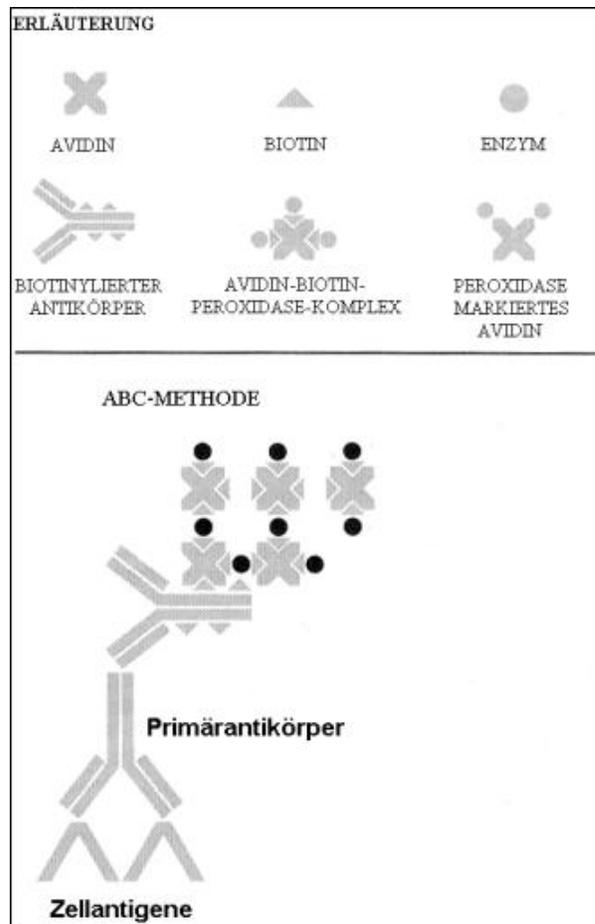
war. Nach 24 Stunden wurden die Matrices erneut mit  $1,2 \times 10^6$  Endothelzellen besiedelt, über Nacht gerollt und für 24 Stunden mit EC-Kulturmedium perfundiert. Abschließend wurde dieser Zyklus ein drittes Mal wiederholt. Die Bioreaktoren blieben nun für weitere zwei Tage an den Versorgungsflaschen unter kontinuierlicher Perfusion angeschlossen, dann konnten die rebesiedelten Venensegmente aus den Reaktoren entnommen werden.

### **3.6. Charakterisierung der rebesiedelten Segmente**

Sowohl die in zwei- als auch dreidimensionaler Kultur rebesiedelten Matrices wurden hinsichtlich verschiedener Kriterien ausgewertet. Es wurden zum einen Übersichtsfärbungen angefertigt die Aufschluss darüber geben sollten, wie sie sich die extrazelluläre Matrix zusammensetzt, und zum anderen wurden immunhistochemische Antikörpermarkierungen durchgeführt, die spezifische Zelltypen über eine Antigen-Antikörperbindung sichtbar machen sollten.

#### **3.6.1. Immunhistochemische Auswertung**

Die Immunhistologie dient dem spezifischen Nachweis von Antigenen, die z.B. von spezifischen Zellpopulationen exprimiert werden, mittels Antikörper. Dabei wurde hier die indirekte Färbung über Primär- und Sekundärantikörper benutzt, die die Empfindlichkeit des Nachweises erhöht. Der Primärantikörper bindet an spezifische Oberflächenproteine der Zellen. Der Sekundärantikörper ist mit dem Protein Biotin konjugiert und erkennt den Primärantikörper. Die sehr spezifische Reaktion von Biotin mit Avidin wird benutzt, um einen Peroxidase/ Avidin-Komplex hinzuzufügen. Dies hat einen zusätzlichen Verstärker-Effekt von vor allem schwachen Signalen zur Folge, denn an ein Biotin-Molekül können vier Avidin-Moleküle binden (s. Abb. 7). Eine braune Färbung des Protein/ Antikörper-Komplexes erfolgt abschließend durch die enzymatische Umsetzung von Diaminobenzidin (DAB) durch das Enzym Peroxidase (POD).



**Abb. 7: Schematisches Modell der immunhistochemischen Färbung**

(Quelle: Sally et al., Dako Corporation, 1989).

Zunächst wurden folgende Stammlösungen für den Waschpuffer der Immunhistologie hergestellt (s. Kap. 2.3.1.):

- Lösung A: Tris-Stocklösung, 1,0 molar, pH 7,5
- Lösung B: NaCl-Stocklösung, 5 M
- Kalziumchlorid-Lösung 1 M

Diese Stammlösungen sind mehrere Monate haltbar, aus ihnen wurde erst kurz vor einer immunhistologischen Untersuchung der benötigte Waschpuffer hergestellt. Dabei wurden 200 ml der Lösung A, 60 ml der Lösung B, 4 ml einer Calciumchlorid-Lösung mit 2 g BSA versetzt und mit Aqua dest. auf 2 Liter aufgefüllt.

Die Verdünnungen der verschiedenen Antikörper erfolgte mit Färbepuffer, dabei handelte es sich um den oben beschriebenen Waschpuffer, der allerdings in diesem Fall 1 % BSA enthielt.

Für die Auswertung der rebesiedelten Gefäßmatrices und der Gefäßexplantate nach den *in vivo*-Versuchen, sowie den Zytospots der EC und MFb wurden folgende Antikörper benutzt:

**Tabelle 3: Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper:**

<b>Antikörper</b>	<b>Einsatz (Zielort)</b>	<b>eingesetzte Konzentration</b>
Kaninchen IgG	negativ- Kontrolle	1,425 µg/ml
Maus IgG	negativ- Kontrolle	2 µg/ml
Maus IgG2b	negativ- Kontrolle	10 µg/ml
monoclonal Maus anti human Desmin, Klon DE-U-10	glatte Muskelzellen	2 µg/ml
monoclonal Maus anti human Vimentin, Klon Vim 3B4	Gefäßzellen (EC und MFb)	0,3 µg/ml
polyclonal Kaninchen anti human von Willebrand-Faktor	Endothelzellen	1,425 µg/ml
monoclonal Maus anti bovine CD11b	Leukozyten	10 µg/ml
M38 Protein	Prokollagen Typ I	1,8 µg/ml
Pferd anti Kaninchen, biotinyliert	Sekundär- Antikörper	37,5 µg/ml
Pferd anti Maus, biotinyliert	Sekundär- Antikörper	10 µg/ml

Vor dem Anfärben der getrockneten Gefrierschnitte und Zytospots wurden diese zunächst 8 Minuten bei -20°C in Aceton auf dem Objektträger fixiert und dann 10 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Um eine gezielte Aufgabe der Antikörper-Verdünnungen und eine gleichmäßige Anfärbung des Präparates zu ermöglichen, wurden die Präparate auf dem Objektträger mit einem Wachsstift umrandet. Die Präparate wurden für 2 bis 5 Minuten in Waschpuffer rehydriert. Zur Vermeidung unspezifischer Färbungen wurden die im zu untersuchenden Gewebe vorhandenen Peroxidasen blockiert. Die Blockierung erfolgte für 30 Minuten in 0,3 % [V/V] Wasserstoffperoxid in Dunkelheit. Zur Entfernung von Wasserstoffperoxid-Resten wurden die Schnitte in Waschpuffer gespült und anschließend für 15 Minuten mit einer 10 %igen [V/V] Verdünnung des Normalserums des Tieres, in dem der

zweite Antikörper produziert wurde (Pferd), blockiert. Die Flüssigkeit wurde von den Schnitten abgeschüttelt. Pro Gewebeschnitt bzw. Zytospot wurden 200 µl der Primärantikörper-Verdünnung aufgegeben. Auf die Negativkontrolle wurde eine Maus, bzw. Kaninchen IgG Antikörper-Lösung gegeben. Die Antikörper inkubierten bei Raumtemperatur eine Stunde in einer Kammer mit 100 % relative Luftfeuchtigkeit. Danach wurde die Lösung entfernt und die Schnitte dreimal in Waschpuffer gespült. Die Zugabe des Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpers folgte für 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Während dieser Zeit wurde ein Avidin-POD-Komplex (Vectastain Kit ABC, s. Kap. 2.2.) aus einem Tropfen Lösung A und einem Tropfen Lösung B in 5 ml Waschpuffer angesetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von den inkubierten Gefrierschnitten und Zytospots wurde die Sekundärantikörperlösung abgeklopft und durch dreimaliges Spülen mit Waschpuffer vollständig entfernt. Es schloss sich die Aufgabe des Avidin-POD-Komplexes an, dieser inkubierte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Nach Abklopfen der Lösung erfolgte ein dreimaliges Spülen mit Waschpuffer. Die Substratlösung (DAB+Substrate-Chromogen System, s. Kap. 2.2.) wurde aus 1 Tropfen DAB auf 1 ml Puffer angesetzt, auf die Schnitte gegeben und für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chromogenreaktion wurde durch dreimaliges Spülen mit Aqua dest. gestoppt.

### **3.6.1.1. Gegenfärbung**

Die Gegenfärbung erfolgte innerhalb von 3 bis 5 Minuten mit HARRIS-Hematoxylin (s. Kap. 2.2.) 1:3 verdünnt mit Aqua dest.. Die Schnitte wurden dreimal mit Aqua dest. gewaschen, um überschüssige Farblösung zu entfernen und 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser nachgefärbt. Dann wurden sie kurz mit Aqua dest. abgespült und 2 Minuten in 96 % [V/V] Ethanol inkubiert. Es schloss sich eine zweiminütige Inkubation in 100 % [V/V] Ethanol an. Durch diese verkürzte Alkoholreihe wurden die Präparate entwässert. Danach wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten in Xylol getaucht. Die Präparate wurden abschließend mit Corbit-Balsam (s. Kap. 2.2.) versiegelt.

### **3.6.2. Markierung von Endothelzellen mit *Ulex europaeus* Lektin**

Zusätzlich zu der immunhistochemischen Färbung der Endothelzell- Zytospots mit anti von Willebrand-Faktor (s. Tab. 3), wurden die Zellen mit einem Lektin von *Ulex europaeus* Typ I markiert (*Ulex europaeus* Agglutinin I = UEA I). UEA I ist ein sensitiver Marker für Endothelzellen und wird häufig dazu verwendet, Endothelzellen über gecoatete Beads zu

sortieren (Iruela-Arispe, 1999 und Sanyal und Mishahi, 1999). UEA I ist konjugiert mit 4 mol/mol Protein Fluorescein Isothiocyanat (FITC). Mit PBS wurde eine Lösung von 100 µg/ml UEA I hergestellt und lichtgeschützt gelagert. Eingefrorene EC-Zytospots wurden 8 Minuten bei -20°C in Aceton auf die Objektträger fixiert, anschließend luftgetrocknet und mit einem Wachsstift umrandet. In einer PBS-Lösung mit 1 % [M/V] bovines Serum Albumin (BSA) wurden die Proben zweimal für jeweils 2 Minuten inkubiert. Die UEA I- Lösung wurde vorsichtig auf die Proben pipettiert. Unter Ausschluss von Licht wurden die Präparate für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Als Kontrollen wurden zwei native ovine Venenschnitte mitgefärbt.

### 3.6.2.1. Gegenfärbung der UEA I- markierten Präparate mit DAPI

Um in der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der mit UEA I gefärbten EC-Zytospots auch unmarkierte Zellen detektieren zu können, wurden die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) gegengefärbt. DAPI besitzt eine hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA und entwickelt dort nach Diffusion durch die Zellmembran starke elektrostatische Interaktionen mit Adenin-Thymin-reichen Regionen (Wang et al., 2000).

Mit PBS wurde eine DAPI- Lösung von 20 µg/ml hergestellt. Diese wurde auf die Proben pipettiert und die Objektträger in einer feuchten Kammer 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde überschüssige DAPI-Lösung mit PBS abgespült und die Proben feucht in Mounting Medium für Fluoreszenzproben (s. Kap. 2.2.) eingebettet.

Am Fluoreszenzmikroskop wurden die markierten Zellen mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfiltern von unterschiedlicher Wellenlänge detektiert:

		<u>λ (Wellenlänge)</u>
<u>Filter für UEA I:</u>	Extinktion:	450 nm
	Emission:	520 nm
<u>Filter für DAPI:</u>	Extinktion:	546 nm
	Emission:	590 nm

### 3.6.3. Übersichtsfärbungen

Sowohl die *in vitro* rebesiedelten klappentragenden Venensegmente, als auch die explantierten Implantate aus den *in vivo*-Versuchen wurden mit verschiedenen Übersichtsfärbungen charakterisiert. Diese Färbungen gaben Aufschluss über den Zustand der

extrazellulären Matrix und über die Verteilung der Gefäßzellen in der Matrix. Neben der H&E-Färbung (s. 3.3.3.) wurde eine Elastika van Gieson- und eine *von Kossa*-Färbung durchgeführt.

Für die Elastika van Gieson-Färbung wurden die Gewebeprobe in 3,7 % [V/V] Formalinlösung fixiert.

### 3.6.3.1. Paraffineinbettung

Die zu untersuchenden Gewebestücke wurden für einige Tage in 3,5 % [V/V] Formalin fixiert. Zur Vorbereitung für die Einbettung in Paraffin wurden die Proben zunächst in Form geschnitten, in kleine Plastikkassetten gelegt und unter fließendem Leitungswasser für 3 Stunden ausgewaschen. Anschließend wurden die Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe jeweils 2 Stunden mit 50, 70, 96 % Ethanol [V/V] und schließlich in absolutem Ethanol entwässert. Aus dem absoluten Alkohol kamen die Präparate zunächst in Chloroform, dann in eine gesättigte Lösung von Paraffin und Chloroform. Diese Chloroform-Paraffin-Lösung wurde auf 40°C erwärmt gehalten. Von diesem Zwischenmedium wurden die Präparate für 60 Minuten in eine mit Paraffin gesättigte Chloroform-Lösung gebracht. Nach dem Durchtränken mit Chloroform-Paraffin wurden die Proben in geschmolzenes reines Paraffin übertragen und für 8 Stunden in den 60°C-Schrank gestellt. Um eine Auskristallisierung des Paraffins zu verhindern, wurden die Präparate im Anschluss zum Abkühlen sofort in den Kühlschrank bei 4°C zum Aushärten gestellt und am nächsten Tag am Mikrotom geschnitten.

### 3.6.3.2. Elastika van Gieson- Färbung

Zur Vorbereitung dieser Dreifach-Färbung wurden folgende Färbelösungen angesetzt:

Resorcin- Fuchsin: Fa. Chroma (s. Kap. 2.2.)

Eisenhämatoxylin: Lösung A: 10 g Hämatoxylin in 1000 ml 96 % [V/V] Ethanol gelöst (unter Erwärmung),

Lösung B: 24,8 g  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  in 1000 ml Aqua dest. gelöst  
+ 10 ml konzentrierte HCl

Gebrauchslösung: Lösung A und B 1:1 gemischt

Pikrofuchsin: 1000 ml gesättigte, wässrige Pikrinsäure bei Raumtemperatur angesetzt  
1 g Säurefuchsin in 50 ml Aqua dest. gelöst

Pikrinsäure gefiltert und mit 50 ml Säurefuchsinlösung vermischt zur Stammlösung

Über eine zweimalige Inkubation für jeweils 5 Minuten in Xylol mit einem anschließenden Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe von 100, 96, 80 und 70 % [V/V] Ethanol wurden die Präparate entparaffiniert. Dann wurden die Objektträger für 30 Minuten in Resorcin-Fuchsin inkubiert und anschließend mit Aqua dest. abgespült. Nach Differenzierung der Gewebeschnitte in 96 % [V/V] Ethanol, wurden sie in 70 % [V/V] Ethanol überführt, um die Konzentration zum Eisenhämatoxylin zu überbrücken. Es folgte die Anfärbung der Zellkerne für 10 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin. Anschließend wurden die Proben mit Leitungswasser fließend gewässert. In der Zwischenzeit wurde die Pikrofuchsinlösung vorbereitet, indem 1 %ige Essigsäure zu 100 ml Stammlösung hinzugefügt wurde. Nach sorgfältigem Abspülen mit Aqua dest. folgte die Inkubation in der vorbereitete Färbelösung für 3 Minuten. Zum Entwässern der Proben, wurden sie über ein aufsteigende Alkoholreihe mit 80 % [V/V], über 96 % [V/V] bis schließlich 100 % Ethanol geführt und dann für jeweils 5 Minuten zweimal in Xylol inkubiert. Mit Corbit-Balsam wurden die Präparate feucht eingedeckt.

In der mikroskopischen Auswertung erschienen:

elastische Fasern:	blau- violett
Zellkerne:	braun- schwarz
kollagenes Bindegewebe:	rot
Plasma, Muskeln und Erythrozyten	gelb

### **3.6.3.3. Kalzifizierungsnachweis**

Alle explantierte Proben wurden im Hinblick auf Kalzifizierung überprüft. Bei der Methode nach *von Kossa* wird Kalzium in den Karbonaten und Phosphaten gegen Silberionen ausgetauscht, die anschließend zu metallischem Silber reduziert werden.

#### **3.6.3.3.1. Versilberung nach „von Kossa“**

Zur Vorbereitung wurde folgende Färbelösung angesetzt:

---

Kernechtrot- Aluminiumsulfat: 0,2 g Kernechtrot wurden in 200 ml kochende 5 % [m/V] Aluminiumsulfatlösung gelöst und nach dem Erkalten filtriert.

Die eingefrorenen Proben wurden aus dem  $-80^{\circ}\text{C}$ -Schrank entnommen und für 8 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Aceton fixiert. Nach vollständigem Lufttrocknen bei Raumtemperatur wurden die Objektträger für 20 Minuten bei hellem Sonnenlicht in 5 % [M/V] Silbernitratlösung gestellt. Zum Entwickeln wurden die Proben 3 Minuten in 1 % [M/V] Pyrogallussäure inkubiert. Es folgte ein Fixierungsschritt in 5 % [M/V] Thiosulfatlösung für 2 Minuten. Mit mindestens 1 Liter frischem Aqua dest. wurden die Objektträger mehrfach gespült. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Kernechtrot- Aluminiumsulfat, hierfür wurden die Proben 3 Minuten in der Färbelösung inkubiert. Nach Abspülen mit Aqua dest. wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (80 %, 90 %, 96 % und 100 % [V/V] Ethanol) entwässert und zweimal für jeweils 5 Minuten in Xylol inkubiert. Mit Corbit-Balsam wurden die Proben feucht eingedeckt.

In der mikroskopischen Auswertung erschienen kalkhaltige Areale braunschwarz, die Zellkerne entsprechend der Gegenfärbung rötlich.

### **3.7. Tierversuche**

Nach Untersuchungen zur Dezellularisierung und Rebesiedlung mit der experimentell festgelegten Zellzahl, wurden die klappentragenden, autolog rebesiedelten Venensegmente im allogenen Schafmodell *in vivo* auf ihre Funktionalität getestet. Als Kontrolle für die Operationstechnik wurden Autotransplantationen durchgeführt, das heißt, die Transplantation der rechten Jugularvene eines Schafes in einem Operationsschritt auf dessen linke Halsseite. Zusätzlich wurden dezellularisierte klappentragende Venensegmente allogenen implantiert. Die Tierversuchsgruppen setzten sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 4: Übersicht über die Versuchstiergruppen:**

Versuchsgruppe	Anzahl der Segmente	Dauer der Implantation (Wochen)
Autotransplantation	2	4
autolog rebesiedelt auf allogener Matrix	4	1
autolog rebesiedelt auf allogener Matrix	7	6
azelluläre allogene Matrix	4	1
azelluläre allogene Matrix	6	6

### 3.7.1. Vorbereitung der klappentragenden Venensegmente auf die Implantation

Kurz vor Implantation der autolog rebesiedelten Venensegmente in die weiblichen Zellspender-Schafe, wurden die Segmente aus den Bioreaktoren entnommen und für den Transport in 50 ml Röhren mit EC-Kulturmedium und 50 U/ml Heparin gelegt. Zur Überprüfung der vollständigen Rebesiedlung wurde von jedem Implantat ein kleines Segment abgetrennt und bis zur immunhistochemischen Charakterisierung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Des Weiteren schloss sich eine Elastika van Gieson-Färbung (s. Kap. 3.6.3.2.) dieser Proben an.

Im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover erfolgten dann die Implantationen der klappentragenden Venensegmente in diejenigen Schafe, von denen die Zellen 6 Wochen zuvor zu Kultivierung und Rebesiedlung entnommen wurden.

Die Venensegmente der azellulären Kontrollgruppen wurden bis zum Tag der Implantation bei 4°C in PBS gelagert. Vor Implantation wurde von jedem Segment ein Stück aus der Wand herausgeschnitten, um die Matrices auf ihre vollständige Zellfreiheit mit Hilfe der H&E-Färbung (s. Kap. 3.3.3.) und einer DNA-Gehalt-Bestimmung (s. 3.3.4.) zu belegen. In einem 50 ml Röhren mit PBS und 50 U/ml Heparin wurden sie zum Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover transportiert.

### 3.7.2. Implantation

Alle Operationen im Tierlabor, d.h. sowohl die Entnahmen der Matrix- und Zellspenderven, als auch die Implantation der rebesiedelten Segmente und deren azelluläre Kontrollen, wurden von Dr. med. Omke Teebken und Dr. med. Thomas Aper durchgeführt.

#### 3.7.2.1. Narkose

Vor Beginn der Narkose wurde 4 mg/kg Körpergewicht Carboprofen unter die Haut injiziert. Über eine venöse Verweilkanüle in der *Vena cephalica* erhielten die Tiere initial 1,5–4,5 mg/kg Körpergewicht Fentanyl (Wirkstoff: Fentanyldihydrogencitrat) sowie 1,2–2,5 mg/kg Propofol (Propofol-Lipuro 1 %). Nach orotrachealer Intubation und Platzierung einer Magensonde wurden die Tiere mechanisch ventiliert (Servo Ventilator, s. Kap. 2.6.) mit Isofluran (Florene, 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether) und 50% Sauerstoff ohne Lachgas (Atemminutenvolumen etwa 5 l bei einer Frequenz von 15/min). Die Narkose wurde durch intravenöse Injektion von Propofol (0,12 mg/kg/min über Perfusor) und Einzelgaben von Fentanyl (1–3 µg/kg Körpergewicht) wirkungsabhängig unter ständiger EKG-Kontrolle aufrecht erhalten. Präoperativ wurde 3 ml pro 50 kg Körpergewicht Tardomyocel intramuskulär zur Infektionsprophylaxe gegeben, perioperativ Ringer-Lösung sowie postoperativ 1 ml (entsprechend 0,3 mg) Buprenorphin. Alle operativen Eingriffe (zur Im-, Trans- und Explantation sowie bei diagnostischen Eingriffen) erfolgten in dieser Weise in Rückenlage mit überstrecktem Hals nach Abwaschen des Operationsgebietes mit Braunoderm und Abdecken mit Tüchern unter sterilen Bedingungen.

#### 3.7.3. Explantation der klappentragenden Segmenten der *Venae jugularis externa*

Als Matrixspender dienten mit Ausnahme der Autotransplantationen männliche Spender. Nach Gabe von 100 IE/kg Körpergewicht Heparin wurden die rechte und linke *Vena jugularis externa* über einzelne Hautinzisionen auf einer Länge von 15 bis 20 cm freigelegt und nach Prüfung auf suffiziente Venenklappen mit dem Finger-Ausstreif-Test entnommen (Jamieson und Chinnick, 1997). Einmündende Venen wurden mit Polyesterfäden ligiert (Mersilene 5/0). Die Segmente wurden in HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) bei 4°C innerhalb von 45 min in das Labor überführt. Der Wundverschluss erfolgte zweischichtig mit einer Subkutannaht mit 2-0 Polyglactin 910 (Vicryl 2-0, Ethicon) und einer Intrakutannaht mit 0 Polyglactin 910 (Vicryl), und einer nochmaligen Hautdesinfektion mit Braunoderm mit abschließendem Sprühverband.

### **3.7.4. Implantation der klappentragenden Venensegmente**

Die unversehrte *Vena jugularis externa* auf der entgegengesetzten Halsseite (nach Entnahme der Zellspender-Vene) wurde über eine Strecke von ca. 7 cm freigelegt. Nach systemischer Heparinisierung (100 IE/kg) und proximaler und distaler Klemmung wurde ein 4 cm langes Segment entfernt und durch ein klappentragendes Venensegment ersetzt. Zunächst wurde die zentrale End-End-Anastomose zwischen 4 Haltnähten (Vermeidung von Einengungen) fortlaufend mit Prolene hergestellt. Da nur suffiziente Klappen implantiert wurden, konnte nach Fertigstellung dieser Naht auf die proximale Gefäßklemme verzichtet werden. Die distale Anastomose erfolgte analog ebenfalls zwischen Haltnähten (Gruss, 2001). Der Wundverschluss erfolgte wie bei der Explantation beschrieben.

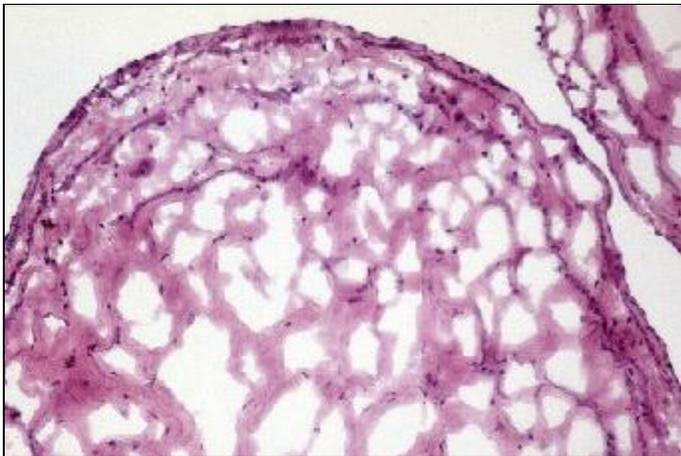
#### **3.7.4.1. Explantation der klappentragenden Venensegmente**

Zur Explantation wurde die *Vena jugularis* mit dem implantierten klappentragenden Venensegmente nach Gabe von 100 IE Heparin/kg Körpergewicht von proximal und distal her, beginnend in nicht operiertem Gebiet, freigelegt. Nach der Entnahme wurden die Segmente sofort mit PBS perfundiert, um den Schluss der Klappe zu beurteilen. Dann wurden die Venen längs aufgeschnitten und die luminale Seite offengelegt, um einen makroskopischen Eindruck im Hinblick auf Thrombosierung zu gewinnen. Mit einer digitalen Kamera wurde dieser Eindruck festgehalten.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Dezellularisierung

Azelluläre klappentragende Venensegmente isoliert aus männlichen Schafen dienten neu aufgesiedelten Gefäßzellen weiblicher Schafe als dreidimensionale Strukturspender. Um bei einer späteren Implantation in die weiblichen Zellspenderschafe Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, war es zwingend notwendig, alle ursprünglichen Gefäßzellen in der männlichen Spendermatrix zu entfernen. Zum anderen war es ebenso wichtig, dass bei dem Prozess der Dezellularisierung die netzwerkartige dreidimensionale Struktur der Matrix möglichst erhalten blieb. Deshalb wurden unterschiedliche Dezellularisierungs-Methoden getestet, die bereits für andere Gewebe oder Organsysteme zur Anwendung gekommen waren. Bewertungsendpunkte waren der Grad der Azellularität und physiologische Strukturen der extrazellulären Matrix (ECM), diese wurden mit Hilfe der Hämalaun & Eosin-Färbung (H&E) bewertet. Die unter Kap. 4.1.1.-4.1.5. dargestellten Methoden, die für die Dezellularisierung der klappentragenden Venensegmente eingesetzt worden sind, ergaben folgende Ergebnisse.



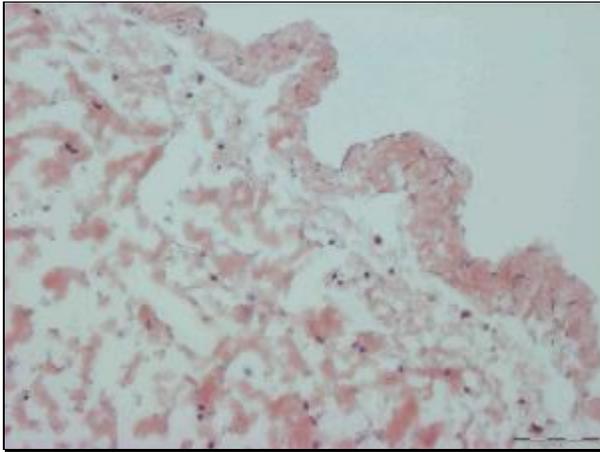
**Abb. 8:** *Native ovine Vene. H&E- Färbung, 200x Vergrößerung*

*Die H&E- Färbung eines Gefrierschnittes einer nativen ovinen Jugularvenenwand zeigt die Anordnung der blau angefärbten Zellen in der extrazellulären Matrix (rosa).*

#### 4.1.1. Dezellularisierung mit Trypsin/ EDTA

Nach Behandlung der Venensegmente mit Trypsin/ EDTA (n=4) zeigte die H&E-Färbung noch ein deutliches Vorhandensein von verbliebenen Zellen in der *Tunica media* und *Tunica*

*adventitia*. Auch die Zellen der *Tunica intima* waren nur teilweise entfernt (s. Abb. 9). Die Quervernetzung der kollagenen Fasern der extrazellulären Matrix war deutlich verändert und degeneriert, wie in Abb. 9 gezeigt. Eine Quervernetzung der Matrixfasern war nicht mehr eindeutig erkennbar.

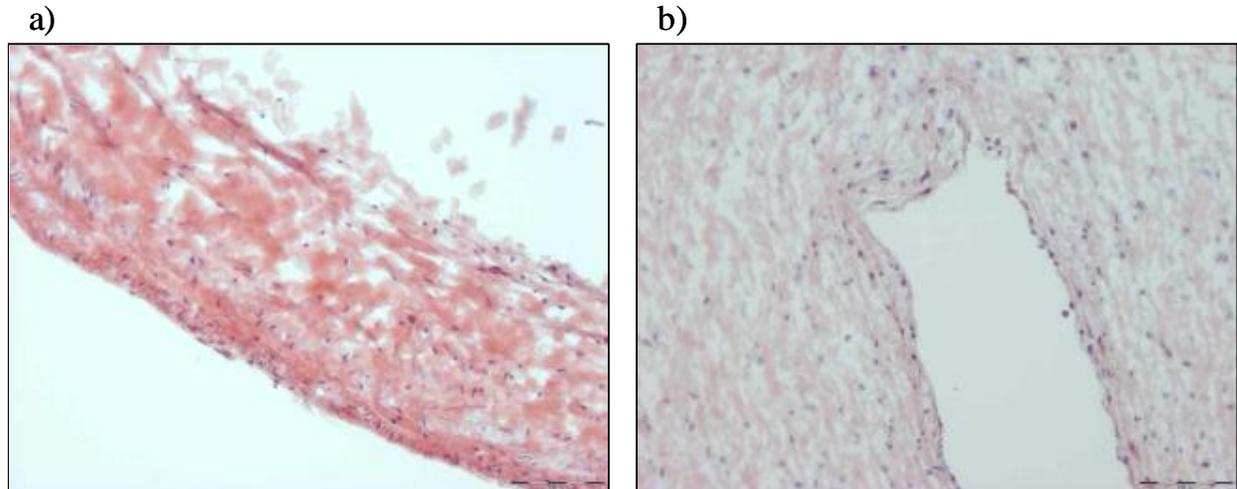


**Abb. 9:** *H&E- Färbung einer Venenwand nach Behandlung mit Trypsin/ EDTA. 100x Vergrößerung*

*Nach Behandlung der Venensegmente mit Trypsin/ EDTA sind in der H&E- Färbung noch deutlich Zellen (blau) in der extrazellulären Matrix (rosa) zu erkennen. Die Quervernetzungen der Matrix sind zum Teil aufgelöst.*

#### **4.1.2. Dezellularisierung mit zwei unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen (A+B Methode)**

Eine Behandlung der Segmente mit zwei unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen (Lösungen A und B) luminal und extraluminal zeigte keinerlei Einfluss auf das Herauslösen der Zellen aus der extrazellulären Matrix. In allen Schichten der Vene waren noch nach 20, 40, 60 und 90 Minuten (jeweils n=2) Zellen in der H&E-Färbung zu sehen. Die extrazelluläre Matrix blieb stabil und zeigte eine gute Quervernetzung der Fasern (s. Abb. 10).



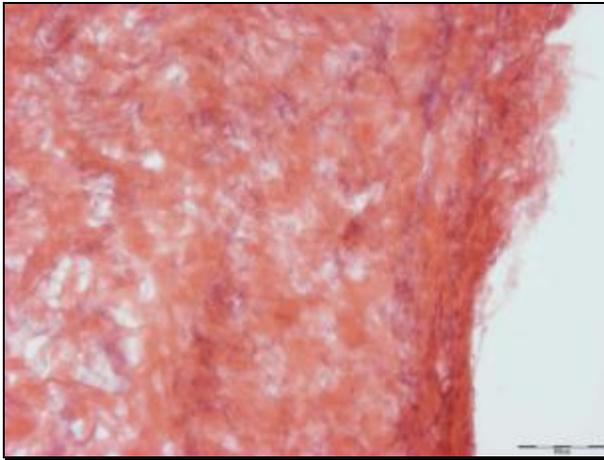
**Abb. 10: Venensegmente nach Behandlung mit zwei verschiedenen Salzlösungen. H&E-Färbungen, 100x Vergrößerung**

*a) Probe nach 40 Minuten Inkubation in jeweils zwei verschiedenen konzentrierten Salzlösungen im Lumen und im Außenmedium (A und B, s. Kap. 3.2.2.). Es sind noch deutlich Zellen (blau) in der Matrix (rosa) zu sehen.*

*b) Probe nach 90 Minuten Inkubation in den jeweiligen Lösungen A und B. Zellen sind ebenfalls noch in der Matrix zu erkennen.*

#### **4.1.3. Dezellularisierung mit Aqua dest.**

Nach Behandlung der Venen (n=2) mit Aqua dest. und anschließender Inkubation in einer DNase-Lösung, zeigten sich die H&E gefärbten Proben vollständig azellulär. Die Kollagenfasern der extrazellulären Matrix waren jedoch durch die Wassereinlagerung stark aufgequollen und eine Quervernetzung nicht mehr erkennbar (s. Abb. 11).

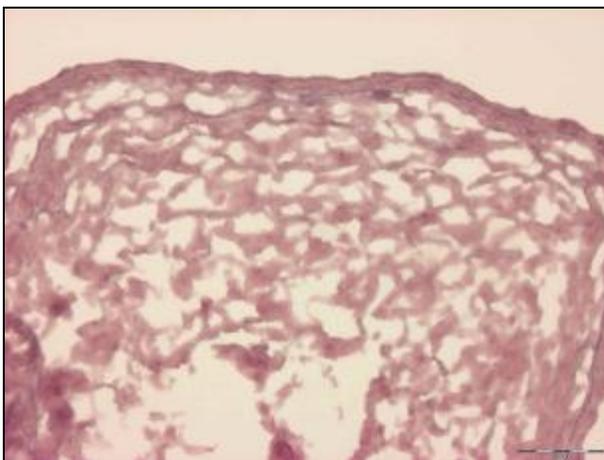


**Abb. 11: Dezellularisierung mit Aqua dest. H&E- Färbung, 100x Vergrößerung**

*Nach Behandlung mit Aqua dest. sind keine Zellen in der Übersichtsfärbung mehr zu erkennen. Die extrazelluläre Matrix ist jedoch aufgrund der Wassereinlagerung stark aufgequollen, so dass Quervernetzungen kaum noch zu erkennen sind.*

#### **4.1.4. Dezellularisierung nach Meezan**

Die Entfernung der Gefäßzellen nach der Methode die erstmals 1975 von Meezan und Mitarbeiter beschrieben wurde, zeigte auch für die Dezellularisierung der Venenklappen (n=2) ein sehr gutes Ergebnis: Die geschnittenen Proben erwiesen sich in der H&E-Übersichtsfärbung als azellulär, die extrazelluläre Matrix war nicht aufgequollen und nahezu wie nativ quervernetzt (s. Abb. 12).

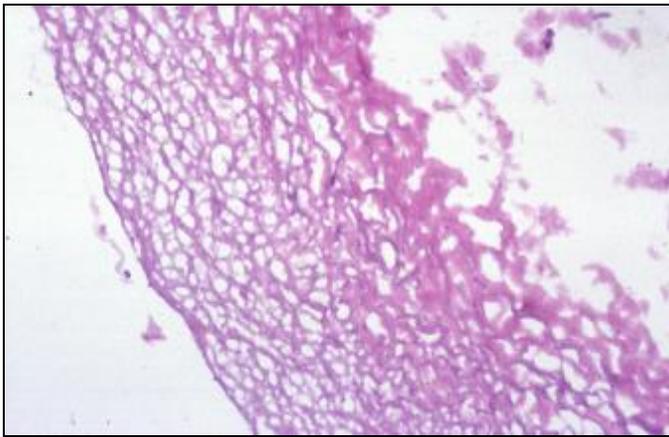


**Abb. 12: Dezellularisierung eines Venensegmentes nach Meezan. H&E- Färbung, 100x Vergrößerung**

*In der H&E-Übersichtsfärbung sind keine Zellen mehr zu erkennen. Die extrazelluläre Matrix ist gut erhalten.*

#### 4.1.5. Dezellularisierung mit Natriumdesoxycholat

Die Chemikalie Natriumdesoxycholat, die auch bei der Methode nach Meezan angewendet worden ist, wurde bei der Dezellularisierung von klappentragenden Venensegmenten in einer 4 % igen Lösung [M/V] mit und ohne Zusatz von 1 % [M/V] Natriumazid getestet. Beide Ansätze wurden mit jeweils zwei Venensegmenten 10, 30, 60 und 90 Minuten unter Schütteln durchgeführt. Bereits nach 30 Minuten Inkubation in den Lösungen waren anhand der H&E-Färbungen nur noch vereinzelt Zellen im Gewebe zu erkennen. Nach 60 und 90 Minuten waren die Proben vollständig azellulär, die extrazelluläre Matrix blieb nach dieser Zeit gut erhalten und quervernetzt (s. Abb. 13). Einen Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne Natriumazid konnte in der H&E-Färbung nicht festgestellt werden.



**Abb. 13: Dezellularisierung mit Natriumdesoxycholat nach 90 Minuten Inkubation; H&E Färbung, 100x Vergrößerung**

*Es sind keine Zellen mehr in der Matrix zu erkennen. Die kollagenen Fasern sind quervernetzt*

**Tabelle 5: Übersicht über die verschiedenen Methoden, die für die Dezellularisierung von klappentragenden Venensegmenten getestet wurden:**

Methode		Anzahl der Venensegmente	Matrixbeschaffenheit	Quervernetzung	Beurteilung über H&E-Färbung
Trypsin/ EDTA		4	+	-	-
A+B Methode (unterschiedlich konzentrierte Salzlösungen)	20 min	2	+	+	-
	40 min	2	+	+	-
	60 min	2	+	+	-
	90 min	2	+	+	-
Aqua dest.		2	-	-	+
Meezan		2	+	+	+
Natriumdesoxy- cholat mit Natriumazid	10 min	2	+	+	-
	30 min	2	+	+	-
	60 min	2	+	+	+
	90 min	2	+	+	+
Natriumdesoxy- cholat ohne Natriumazid	10 min	2	+	+	-
	30 min	2	+	+	-
	60 min	2	+	+	+
	90 min	2	+	+	+

<u>Matrixbeschaffenheit:</u>	aufgequollen	-
	nicht aufgequollen	+
	Quervernetzung positiv	+
	Quervernetzung negativ	-
<u>Beurteilung über H&amp;E- Färbung:</u>	azellulär	+
	nicht azellulär	-

#### 4.1.6. Auswahl der Dezellularisierungsmethode

Nach Austesten der unterschiedlichen Dezellularisierungsmethoden wurde die Behandlung mit Natriumdesoxycholat ohne Natriumazid und einer Inkubationszeit von 90 Minuten ausgewählt. Diese Methode wurde standardmäßig zur Entfernung der Zellen aller klappentragenden Venensegmente, die für eine Rebesiedlung vorgesehen waren, durchgeführt. Vor der Rebesiedlung mit autologen Zellen wurde zusätzlich zur Charakterisierung der Azellularität anhand einer H&E-Färbung eine Isolation der genomischen (gesamt) DNA mit anschließender photometrischer Messung durchgeführt.

#### 4.1.6.1. Bestimmung des DNA- Gehaltes in den dezellularisierten Segmenten

Venenwandgewebe von 11 dezellularisierten und 3 nativen Gefäße wurde in tiefgefrorenem Zustand eingewogen (jeweils ca. 25 mg Gewebe) und anschließend lysiert. Doppelsträngige genomische DNA wurde wie in Kap. 3.3.4. beschrieben aufgereinigt und die Absorption bei 260 nm gegen Aqua dest. photometrisch gemessen. Damit ein linearer Zusammenhang zwischen der optischen Dichte und dem DNA-Gehalt der Lösung gegeben war, mussten die Messwerte für die optische Dichte zwischen 0,150 und 1,000 liegen, wobei eine Absorption von 1,000 mit der Konzentration von  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  gleichzusetzen war. Das Volumen der Proben betrug 0,4 ml, sie wurden für die Messungen nicht weiter verdünnt. Der Gehalt an DNA wurde erst pro  $\mu\text{l}$  aufgereinigter Suspension und anschließend pro mg Einwaage des jeweiligen Gewebes ermittelt:

##### Rechnung:

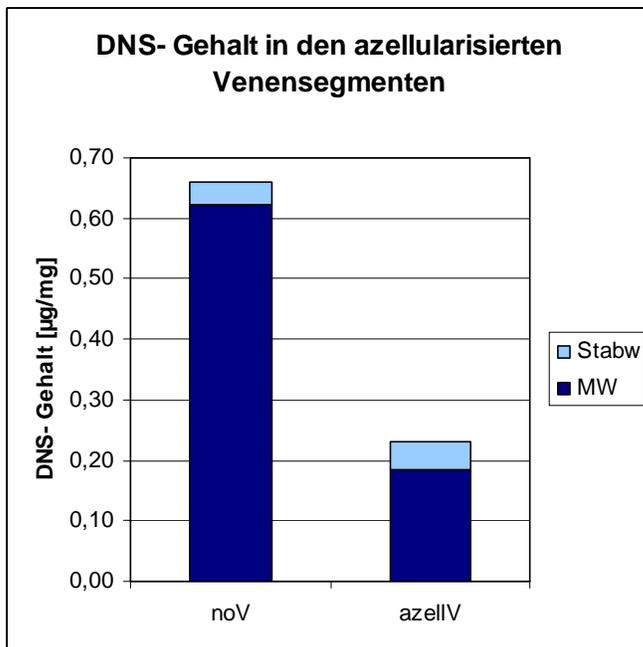
$$A_{260 \text{ nm}} \times 50 \mu\text{g/ml} = \mu\text{g/ml DNA}$$

$$\mu\text{g/ml DNA} \times 0,4 \text{ ml} / \text{mg Einwaage} = \mu\text{g/mg DNA}$$

Der Mittelwert der nativen Proben in  $\mu\text{g/mg DNA}$  betrug  $0,62 \pm 0,04$ , für die dezellularisierten Proben  $0,18 \pm 0,04$  (s. Tab. 6). Der Anteil an DNA in dezellularisierten Proben im Verhältnis zu den ermittelten nativen Kontrollen betrug 29,03 % (vergl. Abb. 14).

**Tabelle 6: Photometrische Bestimmung des DNA- Gehaltes in nativen ovinen Venen (noV) und dezellularisierten Venen (azell):**

Proben	Gewicht (mg)	Absorption bei 260nm	DNS ( $\mu\text{g/ml}$ )	DNS ( $\mu\text{g/mg}$ )	MW ( $\mu\text{g/mg}$ )	Stabw ( $\mu\text{g/mg}$ )
noV	21,70	0,63	12,64	0,58	0,62	0,04
noV	20,00	0,66	13,10	0,66		
noV	22,00	0,69	13,82	0,63		
azell	26,00	0,28	5,54	0,21	0,18	0,04
azell	26,70	0,24	4,84	0,18		
azell	26,50	0,27	5,48	0,21		
azell	23,00	0,29	5,84	0,25		
azell	23,00	0,21	4,22	0,18		
azell	24,00	0,12	2,42	0,10		
azell	25,10	0,22	4,46	0,18		
azell	24,20	0,23	4,62	0,19		
azell	23,00	0,22	4,38	0,19		
azell	23,00	0,13	2,62	0,11		
azell	21,00	0,23	4,66	0,22		

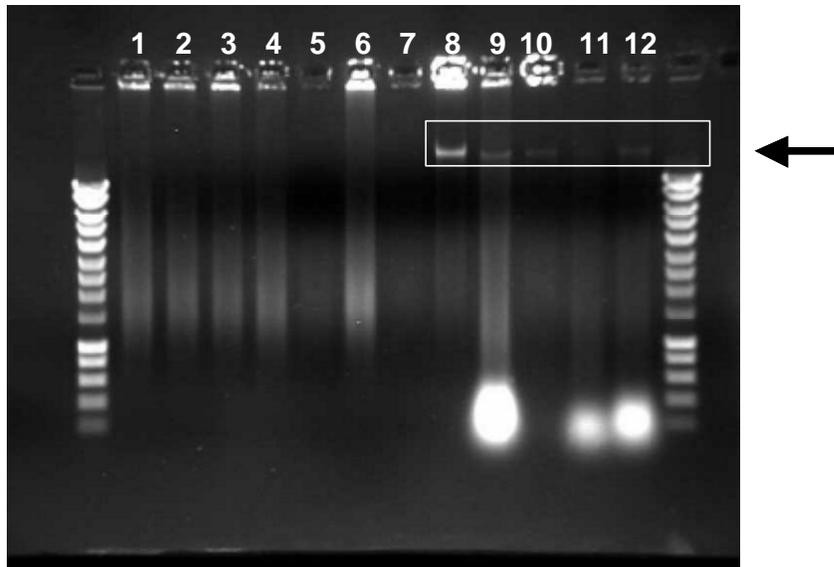


**Abb. 14:** Vergleich des Gehaltes an genomischer DNA in nativen (noV) und dezellularisierten (azellV) Venensegmenten

Dargestellt ist der Gehalt an genomischer, doppelsträngiger DNA dezellularisierter ( $n=11$ ) und nativer Venensegmente ( $n=3$ ).

#### 4.1.6.2. Gelelektrophorese aufgereinigter DNA- Proben

Aufgereinigte, doppelsträngige DNA dezellularisierter ( $n=7$ ) und nativer Gewebeproben ( $n=1$ ) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Parallel dazu wurden zusätzlich Proben *in vitro* rebesiedelter Venensegmente mitgemessen. Die dezellularisierten Proben hinterließen keinerlei Banden im Agarose-Gel, wohingegen bei den rebesiedelten und der nativen Probe eine Bandenbildung beobachtet werden konnte (s. Abb. 15).



**Abb. 15: Gelelektrophorese aufgereinigter genomischer DNA**

*1–12: aufgetragene Proben, rechts und links der Proben: DNA Größenstandards*

*1-7: dezellularisierte Proben*

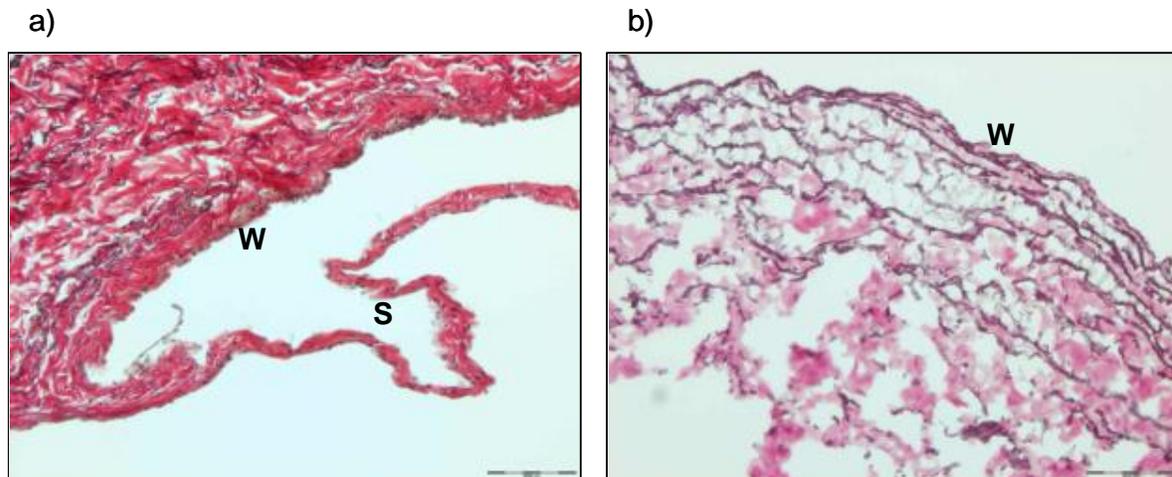
*8: native Kontrolle*

*9-12: rebesiedelte Proben*

*Im eingerahmten Bereich sind Banden sichtbar. Bei den großen, stark positiven Bereichen der Proben 9, 11 und 12 handelte es sich um Degradationsprodukte.*

#### **4.1.7. Elastika van Gieson-Färbung der azellulären Venensegmente**

An den dezellularisierten Venensegmenten wurde zusätzlich zur H&E-Übersichtsfärbung eine Elastika van Gieson-Färbung durchgeführt. Sie belegt, dass nach Entfernung der Zellen die elastischen Fasern erhalten bleiben, die eine wesentliche Funktion für die Stabilität ausüben. In dieser Färbung blau-violett angefärbte Fasern (elastische Fasern) waren vor allem im Bereich der *Tunica media* zu erkennen, während sie in der *Tunica adventitia* nur noch vereinzelt vorkamen (s. Abb. 16 b). Eine Elastika van Gieson-Färbung nativer oviner Vene (s. Abb. 16 a) im Vergleich zeigte die gleiche Verteilung der elastischen Fasern, sowie ein Fehlen dieses Matrixanteiles im Bereich des Venenklappensegels.

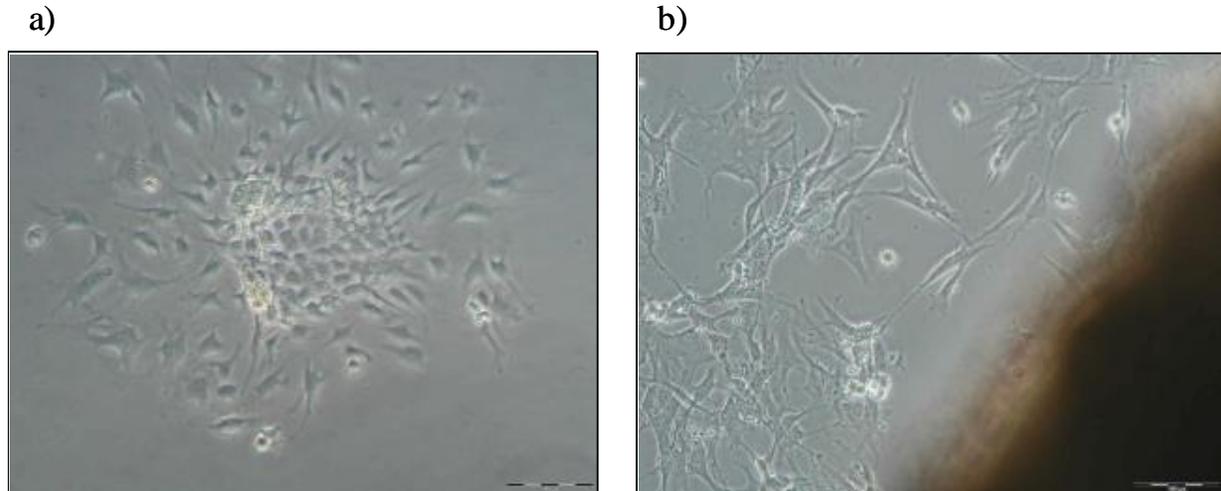


**Abb. 16: Elastika van Gieson- Färbung einer nativen (a) und einer dezellularisierten Venenwand (b). 200x Vergrößerung**

*In der mikroskopischen Auswertung nach der Elastika van Gieson- Färbung wiesen die kollagenen Anteile der extrazellulären Matrix eine rosa Färbung auf, während elastische Fasern blau- violett eingefärbt waren. W = Wandbereich; S = Segel (a).*

#### **4.2. Kultivierung primärer Zellen**

Aus 11 ovinen Jugularvenen der weiblichen Zellspenderschafe wurden die Gefäßzellen isoliert und in Kultur expandiert. Nach Isolierung der Endothelzellen (EC) zeigten die Zellen in den ersten 3 Tagen das für sie typische inselförmige Wachstum (s. Abb. 17 a). Die erste Passagierung der EC konnte bereits nach 5 bis 7 Tagen durchgeführt werden; es wurden für die Rebesiedlungen jedoch nie Zellen nach der 4. Passage verwendet, da eine längere *in vitro* Kultivierungsphase zu Veränderungen der Zellen führt. Aus den adhärennten Venenwandstückchen auf den Gewebekulturschalen wuchsen nach 5 Tagen sternförmig die ersten Myofibroblasten aus (s. Abb. 17 b). Nach 14 Tagen war eine konfluente Zellschicht zu erkennen, diese Zellen wurden daraufhin ebenfalls passagiert. Auch bei den Myofibroblasten (MFb) wurden für die Rebesiedlung nur Zellen bis zu der 4. Passage verwendet.



**Abb. 17:** *primäre venöse Zellen in der Vermehrungsphase, 200x Vergrößerung*

*a) Endothelzellen: 3 Tage nach der Isolierung*

*b) Myofibroblasten: erstes Auswachsen der Zellen nach 5 Tagen Kultur*

#### **4.2.1. Charakterisierung der primären Zellkulturen vor der Rebesiedlung**

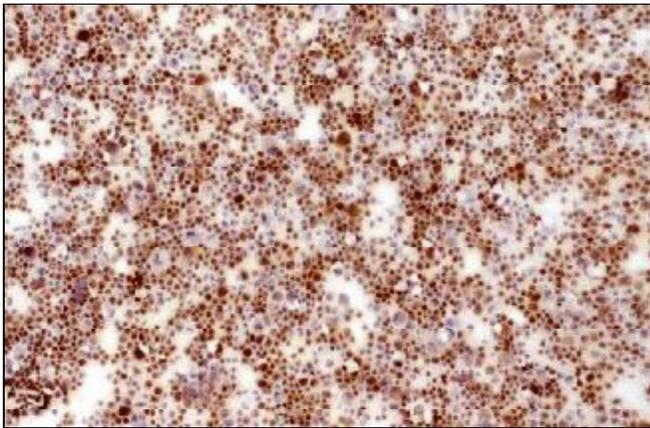
Vor Besiedlung der azellulären Venensegmente mit Endothelzellen (EC) und Myofibroblasten (MFb) wurden die Kulturen mit Hilfe einer Zytocentrifuge auf silanisierte Objektträger gespottet und anschließend immunhistochemisch charakterisiert, um die Anteile der einzelnen Zellpopulationen in den Kulturen zu quantifizieren. Diejenigen Zell-Immunkomplexe, die durch die gebundene Peroxidase das Substrat Diaminobenzidin (DAB) umsetzen konnten, erschienen in der mikroskopischen Auswertung braun. Negative Zellen erschienen aufgrund der Hämatoxylin-Gegenfärbung blau.

##### **4.2.1.1. Endothelzellen**

Die immunhistochemische Charakterisierung der Endothelzell-Zytospots mittels anti von Willebrand-Faktor wurde mikroskopisch untersucht und ausgewertet (s.Abb. 18 und 19). Durchschnittlich waren  $42,02 \pm 6,16$  % der Zellen (n=11) von Willebrand-Faktor positiv. Eine weitere Charakterisierung mit anti-Desmin, einem glatten Muskelzell- Marker, ergab ein vollständig negatives Ergebnis. Alle Zellen auf dem Zytospot waren für anti-Vimentin positiv, ein Antikörper der alle Gefäßzellen markiert, also EC, glatte Muskelzellen (SMC) und Fibroblasten (Fb).

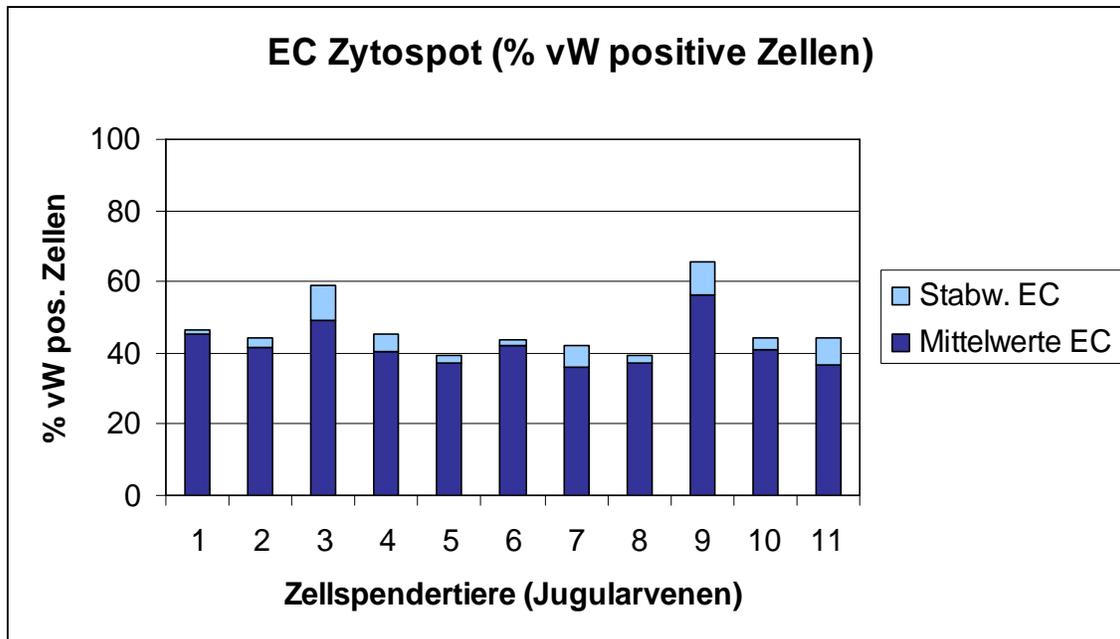
Als zusätzlicher Marker für Endothelzellen wurde auf den Zytospots *Ulex europaeus* Agglutinin Typ I (UEA I) mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) konjugiert, eingesetzt. Die

Zellkerne wurden zur Lokalisation der nicht UEA I-markierten Zellen mit DAPI gegengefärbt. Fluoreszenzmikroskopisch konnten die so markierten Zellen mit Hilfe zweier verschiedener Filter für Extinktion und Emission ausgewertet werden. Als Positivkontrolle wurden Gewebeschnitte von nativer oviner Vene mitgefärbt. Sowohl das Endothel dieser nativen Kontrollen, als auch sämtliche Zellen auf den EC-Zytospots erschienen in der mikroskopischen Auswertung grün, die Zellkerne entsprechend der DAPI-Kernfärbung blau (s. Abb. 20 a und c).



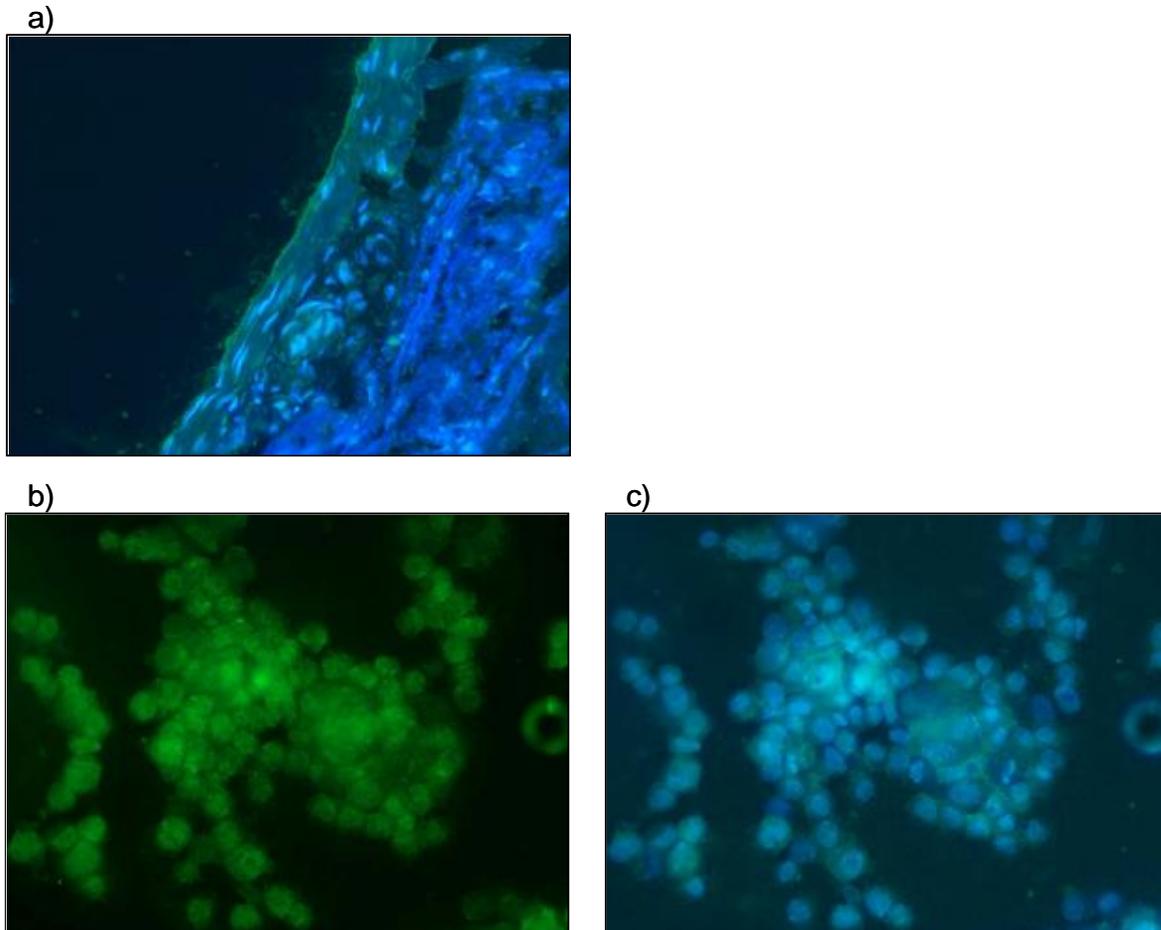
**Abb. 18: Immunhistochemische Färbung mit anti-von Willebrand-Faktor (vW) auf einem EC Zytospot. 100 x Vergrößerung.**

*Die vW positiven Zellen sind braun markiert. Deutlich zu erkennen sind jedoch auch vW negative Zellen (blau gegengefärbt).*



**Abb. 19: Anteil der von Willebrand positiven Zellen der EC-Zytospots**

Es wurden von allen für die *in vivo*-Versuche vorgesehenen EC Zytospots ( $n=3$ ) angefertigt. Auf ihnen wurden immunhistochemisch mit anti von Willebrand-Faktor die EC markiert, mikroskopisch ausgezählt und anteilig auf die Gesamtpopulation hochgerechnet ( $n=11$ ). Der durchschnittliche Anteil von EC aller 11 weiblichen Zellspender-Tiere betrug  $42,02 \pm 6,16$  %.



**Abb. 20: UEAI-Färbung eines EC-Zytospots mit DAPI- Kernfärbung. 200x Vergrößerung**

*a) native ovine Vene (positiv- Kontrolle)*

*b) und c) EC- Zytospots*

*Abgebildet ist der gleiche Ausschnitt unter Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenz-Filter:*

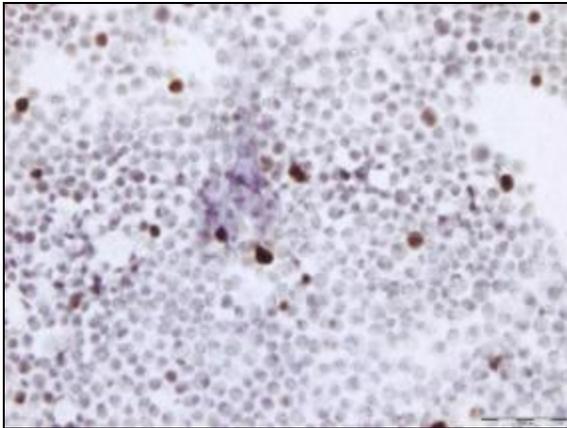
*a) und c) Extinktion: 546 nm, Emission: 590 nm*

*b) Extinktion: 450 nm, Emission: 520nm*

*UEAI markierte Zellen fluoreszieren grün, DAPI markierte Zellkerne blau.*

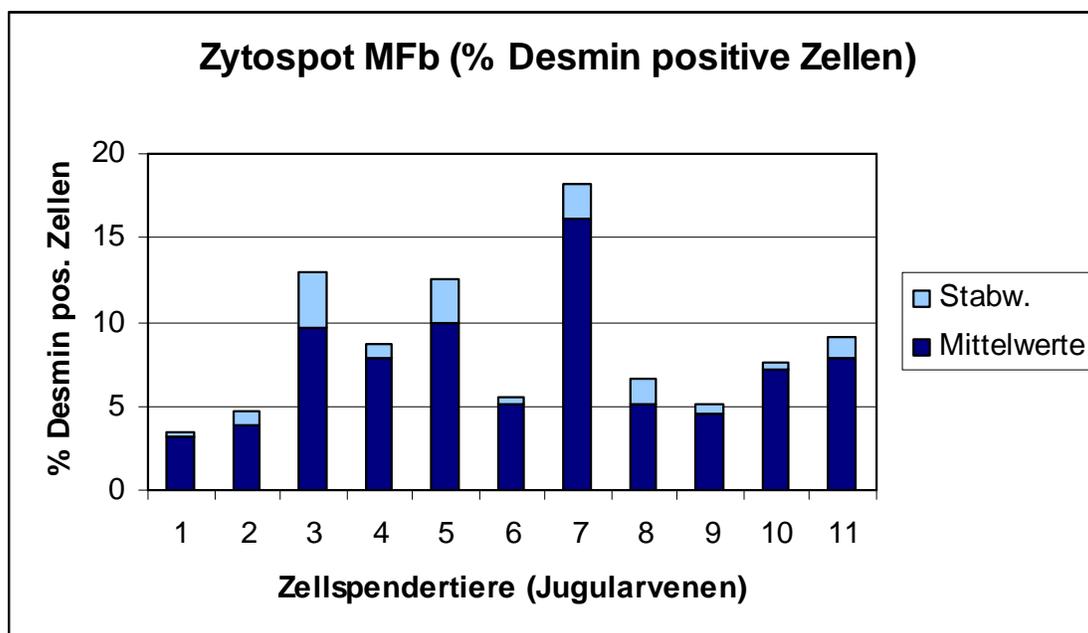
#### **4.2.2. Myofibroblasten**

Die Zellen auf den MFb-Zytospots wurden immunhistochemisch gegen Vimentin und Desmin gefärbt (n=11). Für Vimentin waren alle Zellen positiv, für Desmin durchschnittlich  $7,32 \pm 3,70$  % (s. Abb. 21 und 22). Um auszuschließen, dass es sich bei den übrigen Zellen um EC handeln könnte, wurde eine zusätzliche immunhistochemische Färbung gegen von Willebrand-Faktor durchgeführt. Diese war vollständig negativ.



**Abb. 21: Immunhistochemische Färbung mit anti Desmin auf einem MFb Zytospot. 200 x Vergrößerung**

Die Desmin positiven Zellen sind braun markiert. Desmin negative Zellen erscheinen blau (entsprechend der Gegenfärbung mit Hämatoxylin).



**Abb. 22: Anteil an Desmin-positiven Zellen der MFb-Zytospots.**

Es wurden von allen für die *in vivo*-Versuche vorgesehenen MFb Zytospots ( $n=3$ ) angefertigt. Auf ihnen wurden immunhistochemisch mit anti Desmin die glatten Muskelzellen markiert, mikroskopisch ausgezählt und anteilig auf die Gesamtpopulation hochgerechnet ( $n=11$ ). Der durchschnittliche Anteil aller Desmin-positiven Zellen der 11 weiblichen Zellspender-Tiere betrug  $7,32 \pm 3,70$  %.

### **4.3. Rebesiedlung**

Für die Rebesiedlung der azellulären Venensegmente *in vitro* mussten zunächst die Zellzahlen der Endothelzellen und Myofibroblasten optimiert werden. Daher wurden ausgeschnittene Stückchen der azellulären Venenwand in einer zweidimensionalen Kultur mit unterschiedlichen Zelldichten rebesiedelt. Nach 1 bis zu 10 Tagen wurden die Stücke aus dem Kulturgefäß entnommen, tiefgefroren und geschnitten. Der Erfolg der Rebesiedlung wurde anhand einer H&E-Färbung beurteilt.

#### **4.3.1. Zweidimensionale Rebesiedlung in einer Kulturplatte (mit 24 Vertiefungen)**

Mit einer Gewebestanze ausgeschnittene Venenwandstückchen wurden mit unterschiedlichen Zelldichten von EC und MFb in einer Kulturplatte mit 24 Vertiefungen rebesiedelt. Aus diesen zweidimensionalen Kulturen wurden nach 1, 3, 5 und 10 Tagen Proben entnommen und anhand von H&E-Färbungen die Adhäsion und Migration der Zellen auf der Matrix bewertet (s. Tab. 7). Die Rebesiedlung mit EC zeigte bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  in 5 ml EC-Kulturmedium eine erste Adhäsion an der Matrix nach 3 Tagen Inkubation, bildete jedoch noch kein konfluentes Endothel. Nach 5 Tagen war eine lückenlose Endothelzellschicht zu erkennen. Ein erstes Anheften der MFb konnte bei einer eingesetzten Zelldichte von  $5 \times 10^5$  in 5 ml MFb-Kulturmedium nach 5 Tagen Inkubation beobachtet werden, nach weiteren 5 Tagen waren die Zellen vollständig in die extrazelluläre Matrix eingewandert.

Höhere Zelldichten als für EC und MFb erwähnt wurden nicht eingesetzt, diese führten in Vorversuchen zu Verklumpungen der Zellen untereinander.

**Tabelle 7: Anpassung der Zelldichten von EC und MFb in einer zweidimensionalen Besiedlung:**

EC (in 5 ml)	konfluentes Endothel nach Tagen:			
	1	3	5	10
$1 \times 10^3$	-	-	-	-
$5 \times 10^3$	-	-	-	-
$1 \times 10^4$	-	-	-	-
$5 \times 10^4$	-	-	-	-
$1 \times 10^5$	-	+/-	+	+

konfluentes Endothel +  
 nicht konfluentes Endothel +/-  
 keine adhärennten Endothelzellen -

MFb (in 5 ml)	Einwandern in die Matrix nach Tagen:			
	1	3	5	10
$5 \times 10^3$	-	-	-	-
$1 \times 10^4$	-	-	-	-
$5 \times 10^4$	-	-	-	-
$1 \times 10^5$	-	-	-	-
$5 \times 10^5$	-	-	+/-	+

MFb in die Matrix eingewandert +  
 MFb nur teilweise eingewandert +/-  
 keine MFb eingewandert -

#### 4.4. Dreidimensionale Rebesiedlung klappentragender Venensegmente im Bioreaktor

Die dezellularisierten klappentragenden Venensegmente wurden der Länge nach aufgeschnitten und ausgemessen. Der Durchmesser der Vene betrug im Durchschnitt 3 cm, die Länge wurde auf 6 cm begrenzt. Die zu besiedelnde Fläche betrug demnach  $18 \text{ cm}^2$ . In den zweidimensionalen Rebesiedlungsversuchen wurden optimale Zellzahlen für EC und MFb ermittelt, die zu besiedelnde Fläche betrug dort  $1,54 \text{ cm}^2$ . Für eine Fläche von  $18 \text{ cm}^2$  wurden folgenden Zellmengen benötigt:

**EC:**

$$1,54 \text{ cm}^2 = 1 \times 10^5 \text{ Zellen}$$

$$18 \text{ cm}^2 = X \text{ Zellen}$$

$$\frac{18 \text{ cm}^2 \times 1 \times 10^5}{1,54 \text{ cm}^2} = 1,1688 \times 10^6 \text{ Zellen} \rightarrow \text{aufgerundet: } 1,2 \times 10^6$$

**MFb:**

$$1,54 \text{ cm}^2 = 5 \times 10^5 \text{ Zellen}$$

$$18 \text{ cm}^2 = X \text{ Zellen}$$

$$\frac{18 \text{ cm}^2 \times 5 \times 10^5}{1,54 \text{ cm}^2} = 5,84 \times 10^6 \text{ Zellen} \rightarrow \text{aufgerundet: } 6 \times 10^6$$

Für die Besiedlung der Venensegmente mit Endothelzellen wurde eine Zellzahl von  $1,2 \times 10^6$  Zellen für die gesamte luminale Oberfläche eingestellt. Die Zellzahl der Myofibroblasten für die Rebesiedlung der Venenwand über die Adventitia (die Zellen wurden hierbei in das Außenmedium des Bioreaktors gegeben) wurde auf  $6 \times 10^6$  eingestellt. Mit diesen Zellmengen wurden die azellulären Venensegmente über einen Zeitraum von 2 Wochen im Bioreaktor, wie unter 3.5.3. beschrieben, rebesiedelt. Erreicht wurden die Zellzahlen von der Isolation bis zum Beginn der Rebesiedlung in einem Zeitraum von 4 Wochen. Die gesamte Dauer der Herstellung von klappentragenden Venensegmenten *in vitro* betrug mit Rebesiedlungsphase 6 Wochen.

**4.5. Charakterisierung dreidimensional rebesiedelter Segmente**

Nach zweiwöchiger Rebesiedlung und Kultur der Venenklappensegmente unter Rotation und Perfusion im Bioreaktor (s. Kap. 3.5.2.–3.5.3.2.) und noch vor Implantation in die weiblichen Zellspenderschafe wurde der Erfolg der Besiedlung sowohl durch Übersichtsfärbungen als auch durch immunhistochemische Antikörpermarkierung belegt. Hierfür wurden verschiedene Bereiche aus der Venenwand herausgeschnitten.

**4.5.1. Elastika van Gieson-Färbung**

Die Elastika van Gieson-Färbung der rebesiedelten Segmente zeigte kaum einen Unterschied zu den azellulär gefärbten Proben (vergl. Abb. 16 b und Abb. 23). Im Bereich der *Tunica media*, direkt im Anschluss an die *Tunica intima* waren elastische Fasern längs verlaufend blau-violett angefärbt zu erkennen. In der *Tunica adventitia* war der Anteil an kollagenen Fasern (rosa) deutlich höher, elastische Fasern waren hier querverlaufend angeschnitten.

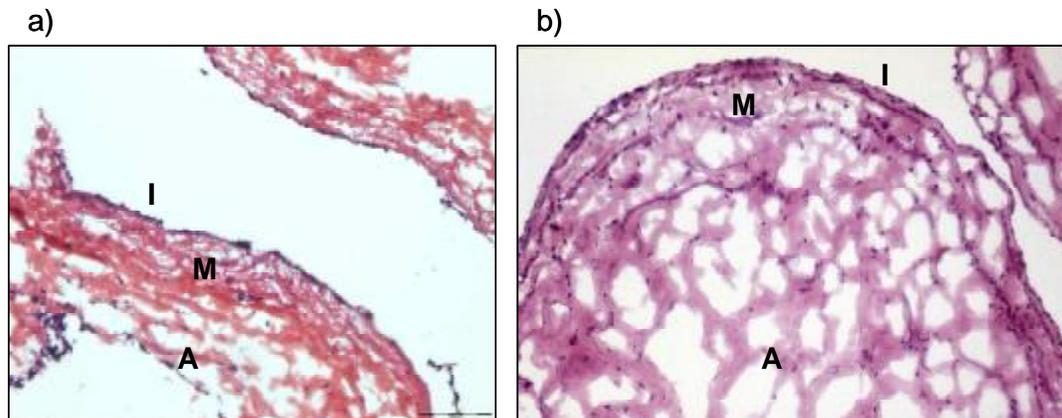


**Abb. 23: Elastika van Gieson-Färbung eines im Bioreaktor rebesiedelten Venensegmentes. 200x Vergrößerung.**

*L = Lumen, q EF = querverlaufende elastische Fasern, l EF = längsverlaufende elastische Fasern*

#### **4.5.2. H&E-Färbung**

In der Hämalaun & Eosin Übersichtsfärbung konnte ein konfluenten Monolayer von Zellen im Bereich der *Tunica intima* beobachtet werden (s. Abb. 24 a). Im Anschluss an die Intima waren interstitielle Zellen in der extrazellulären Matrix sichtbar. Der Vergleich mit nativen Präparaten ergab deutlich weniger interstitielle Zellen in den rebesiedelten als in den nativen Proben (vergl. Abb. 24 b). Am äußeren Randbereich der *Tunica adventitia* waren zahlreiche Zellen zu erkennen, die zum Zeitpunkt der Entnahme der rebesiedelten Venensegmente aus den Bioreaktoren zwar schon an der Matrix adhärten, jedoch nicht in sie eingewandert waren.



**Abb. 24:** H&E- Färbung rebesiedelter (a) und nativer (b) Venensegmente. a = 100x Vergrößerung; b = 200x Vergrößerung

I = Intima, M = Media, A = Adventitia

Nach dreidimensionaler Rebesiedlung im Bioreaktor zeigten die Wandbereiche in der H&E-Färbung einen Zell- Monolayer im Bereich der Intima (a, I). Interstitielle Zellen sind im rebesiedelten Präparat (a) deutlich weniger zu erkennen, als in der nativen Kontrolle (b). Im äußeren Randbereich der Adventitia (A) sind adhärenente Zellen zu erkennen, die noch nicht in die extrazelluläre Matrix eingewandert sind (a).

#### 4.5.3. Immunhistochemische Charakterisierung

Die im Bioreaktor autolog rebesiedelten Venensegmente wurden immunhistochemisch mit folgenden Antikörpern charakterisiert: anti-Vimentin (Gefäßzellen-spezifisch), anti-von Willebrand-Faktor (Endothelzell-spezifisch) und anti-Desmin (spezifisch für glatte Muskelzellen).

##### 4.5.3.1. Endothelzellen

In 7 von 11 besiedelten Proben wurde ein konfluenten Endothelzellmonolayer luminal nachgewiesen. In zwei Fällen konnten Lücken im Endothel dargestellt werden (s. Tab. 8, Proben Nr. 5 und 8), zwei weitere zeigten an einigen Stellen ein mehrschichtiges Endothel (s. Tab. 8, Proben 3 und 4). Eine interstitielle Vaskularisierung, die in den nativen Kontrollen beobachtet wurde (s. Abb. 25 c), konnte in den rebesiedelten Proben nicht gefunden werden.

##### 4.5.3.2. Myofibroblasten

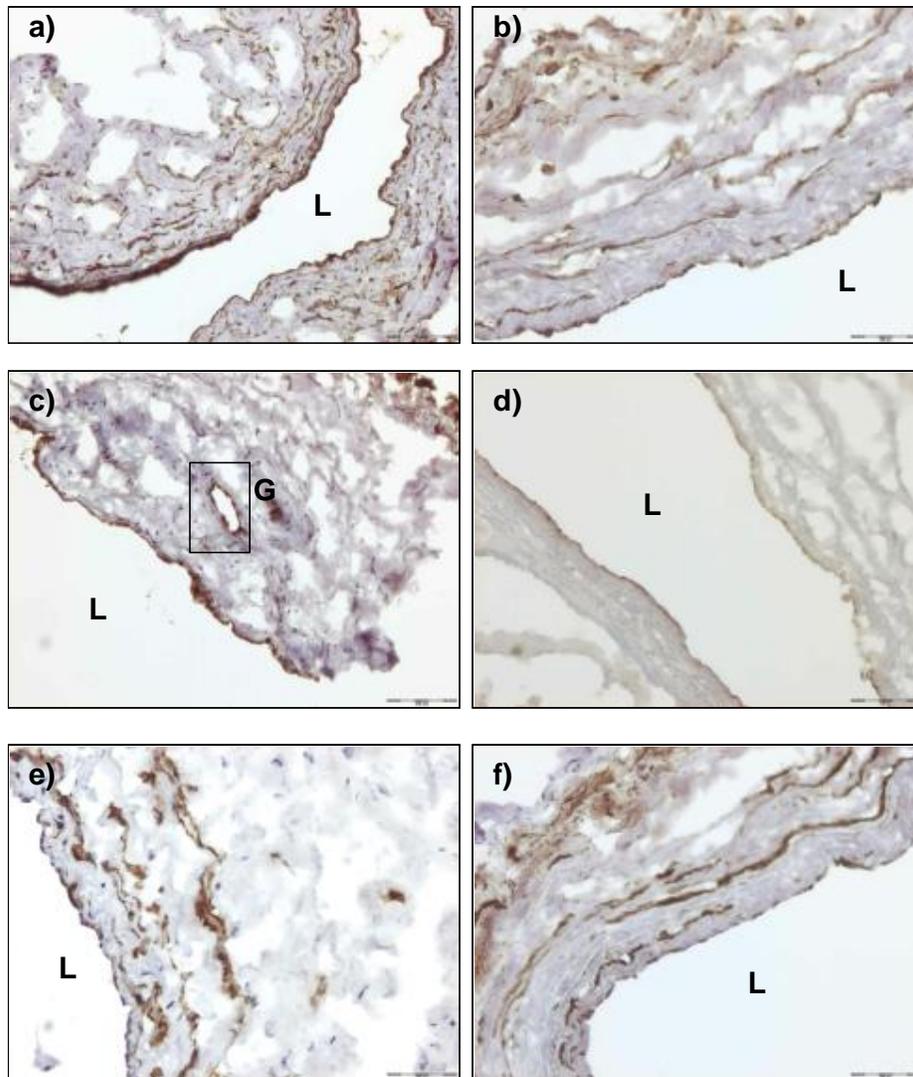
Alle Zellen in den rebesiedelten klappentragenden Venensegmenten waren Vimentin-positiv (s. Abb. 25 b). Es handelte sich also bei allen Zellen um Gefäßzellen. Vimentin-negative Zellen waren in keinem der Präparate zu finden. Glatte Muskelzellen, identifiziert durch

Desmin, waren in 9 von 11 Fällen bis in die *Tunica media* eingewandert und bildeten dort längsverlaufende Fasern (s. Abb. 25 f). In zwei Fällen konnten nur einzelne Desmin-positive Zellen im Bereich der *Tunica adventitia* beobachtet werden, die sich noch nicht zu Fasern zusammengefunden hatten (s. Tabelle 8, Proben 7 und 10).

**Tabelle 8: Immunhistochemische Charakterisierung der rebesiedelten Venensegmente:**

rebesiedelte Segmente (autologe Zellen Schafe 1–11)	Vimentin – Gefäßzellen	Von Willebrand- Faktor		Desmin – glatte Muskelzellen
		Endothel	Vaskularisierung	
1	+	+	-	+
2	+	+	-	+
3	+	++	-	+
4	+	++	-	+
5	+	+/-	-	+
6	+	+	-	+
7	+	+	-	-
8	+	+/-	-	+
9	+	+	-	+
10	+	+	-	-
11	+	+	-	+

<u>Vimentin:</u>	Gefäßzellen (alle positiv)	+
<u>vWillebrand- Faktor:</u>	Endothel konfluent	+
	Endothel mehrschichtig	++
	teilweise Endothel beschichtet	+/-
	keine Endothelbeschichtung	-
	Vaskularisierung vorhanden	+
	keine Vaskularisierung	-
<u>Desmin:</u>	glatte Muskelzellen in der Media	+
	keine glatten Muskelzellen	-



**Abb. 25: Immunhistochemische Charakterisierung rebesiedelter Venensegmente**

Positive Zellen zeigen eine braune Färbung, negative entsprechend der Gegenfärbung eine Blaue.

a), c) und e) = native ovine Vene

b), d) und f) = rebesiedelte Vene

a) und b) = anti-Vimentin

c) und d) = anti-von Willebrand-Faktor

e) und f) = anti-Desmin

L = Lumen

G = Gefäß → interstitielle Vaskularisierung

#### 4.6. Tierversuche

*In vivo*-Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Versuchsgruppen durchgeführt: An einer Kontrollgruppe mit Autotransplantaten, an azellulären und *in vitro* rebesiedelten

Venenklappensegmenten. Die azellulären und die rebesiedelten Segmente wurden jeweils als Kurz- und als Langzeitversuche eingesetzt, d.h. für 1 und 6 Wochen implantiert.

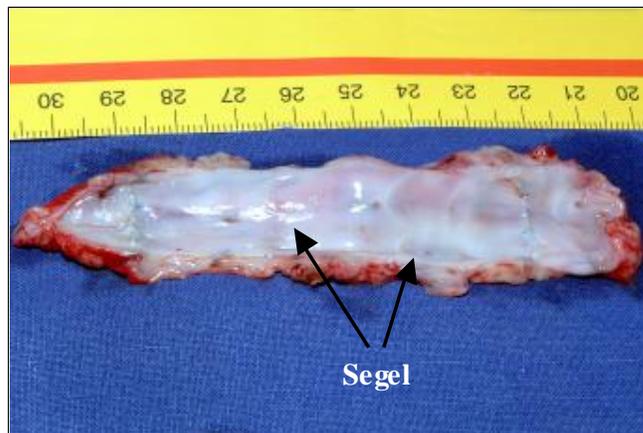
Die *in vivo* Funktionalität der mit Hilfe des Tissue Engineering hergestellten klappentragenden Venensegmente wurde in einem allogenen Tierversuch im Hinblick auf Kompatibilität und Thrombogenizität getestet. Dezellularisierte und *in vitro* mit Zellen des Empfängers rebesiedelte klappentragende Venensegmente wurden in Jugularvenen-Position in weibliche Schafe implantiert. Nach 1 bis 6 Wochen (s. Tab. 4 in Kap. 3) wurden die Tiere getötet und die Implantate entnommen. Diese Explantate wurden vor Implantation mit PBS perfundiert, um eine Klappensuffizienz bzw. Insuffizienz festzustellen. Zur makroskopischen Darstellung der luminalen Gefäßwand wurden die explantierten Venenklappensegmente der Länge nach aufgeschnitten und fotografiert. Es schloss sich die Entnahme von Gewebeproben aus dem Klappenbereich zur späteren histologischen und immunhistologischen Analyse an. Als Übersichtsfärbung und zur Beurteilung von Matrixkomponenten wurde an Paraffinschnitten der Explantate Elastika van Gieson-Färbungen durchgeführt. Kalzifizierungen wurden mit der Versilberungsmethode nach *von Kossa* ebenfalls an Paraffinschnitten durchgeführt. Die immunhistochemische Auswertung von Gefrierschnitten der Explantate umfasste neben Charakterisierung der Zelltypen mit Vimentin, Desmin und von Willebrand-Faktor zusätzlich eine Markierung von Leukozyten mit CD11b und eine Markierung von Prokollagen Typ I mit M38-Protein.

#### **4.6.1. Auswertung der Autotransplantate**

Als Kontrolle für die Operationstechnik wurden Autotransplantationen durchgeführt, das heißt, die Transplantation der rechten Jugularvene eines Schafes in einem Operationsschritt auf dessen linke Halsseite (n=2). Nach 4 Wochen im Tier wurden die Segmente explantiert und charakterisiert.

##### **4.6.1.1. Explantation**

Direkt nach Explantation konnte über eine Perfusion mit PBS eine vollständige Suffizienz der Klappen bestätigt werden. Nach Aufschneiden der Venen erschienen die luminalen Oberflächen glatt und weiß, sie waren optisch nicht von dem nativen Gewebe jenseits der Anastomosen zu unterscheiden. Eine Thrombusformation konnte ebenfalls nicht makroskopisch beobachtet werden (s. Abb. 26). Mit einer Pinzette ließen sich die Venenklappensegel leicht von der Gefäßwand anheben.



**Abb. 26:** *Autotransplantat eines klappentragenden Venensegmentes nach 4 Wochen Implantation – luminale Ansicht des Explantates.*

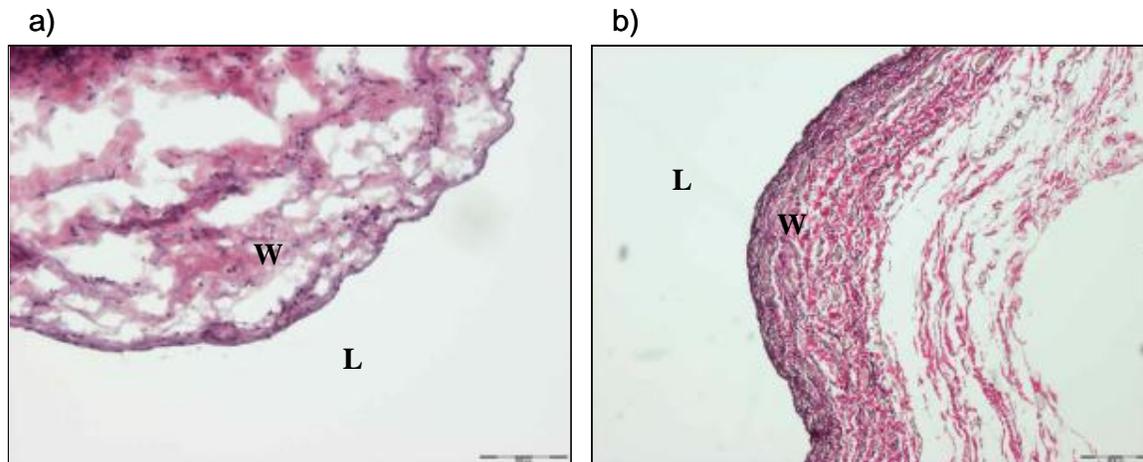
*Nach Explantation des implantierten Segmentes wurde es der Länge nach aufgeschnitten und das Lumen fotografiert. Die luminale Oberfläche war glatt und weiß, eine Thrombusformation war nicht zu erkennen. Die Segel der Venenklappen waren deutlich zu erkennen.*

#### **4.6.1.2. Übersichtsfärbungen der Autotransplantate**

Sowohl in der H&E- als auch in der Elastika van Gieson-Färbung konnten keinerlei Auflagerungen auf Gefäßwand oder Venenklappensegel beobachtet werden. Interstitielle und luminale Zellen waren normal verteilt (s. Abb. 27 a). In der *Tunica media* und vereinzelt in der *Tunica adventita* waren elastische Fasern zu erkennen (s. Abb. 27 b).

#### **4.6.1.3. Kalzifizierungsnachweis nach „von Kossa“**

Der Kalzifizierungsnachweis nach „von Kossa“ war für beide Autotransplantate negativ. Es konnten nur entsprechend der Gegenfärbung mit Kernechtrot Zellen und Matrixfasern erkannt werden (s. Abb. 28).

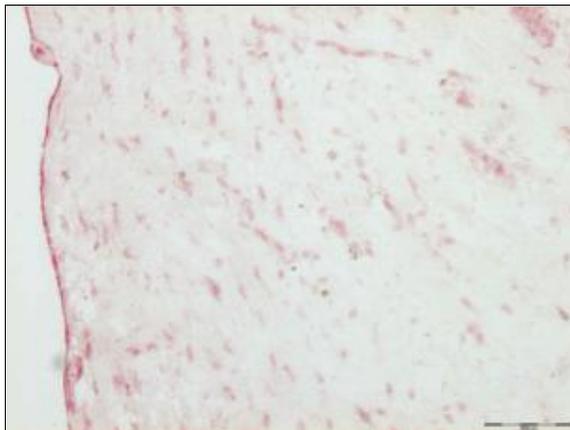


**Abb. 27: Übersichtsfärbungen der Autotransplantate**

a) H&E-Färbung, 100x Vergrößerung

b) Elastika van Gieson-Färbung, 40x Vergrößerung

L= Lumen; W= Gefäßwand



**Abb. 28: Von Kossa-Färbung einer Autotransplantates, 200x Vergrößerung**

Im Gewebeschnitt sind keine braun-schwarzen Areale zu erkennen. Zellen und Matrix erscheinen entsprechend der Gegenfärbung mit Kernechtrot rosa.

#### 4.6.1.2. Immunhistochemische Auswertung der Autotransplantate

##### 4.6.1.2.1. Endothelzellen

Nach 4 Wochen Implantation der Autotransplantate im Schaf wiesen beide Explantate eine konfluente Endothelzellschicht auf Gefäßwand und Segel auf. Zusätzlich zeigten sie eine Vaskularisierung im Bereich der Adventitia, die in ihrer Quantität der nativer Proben entsprach.

#### 4.6.1.2.2. Glatte Muskelzellen

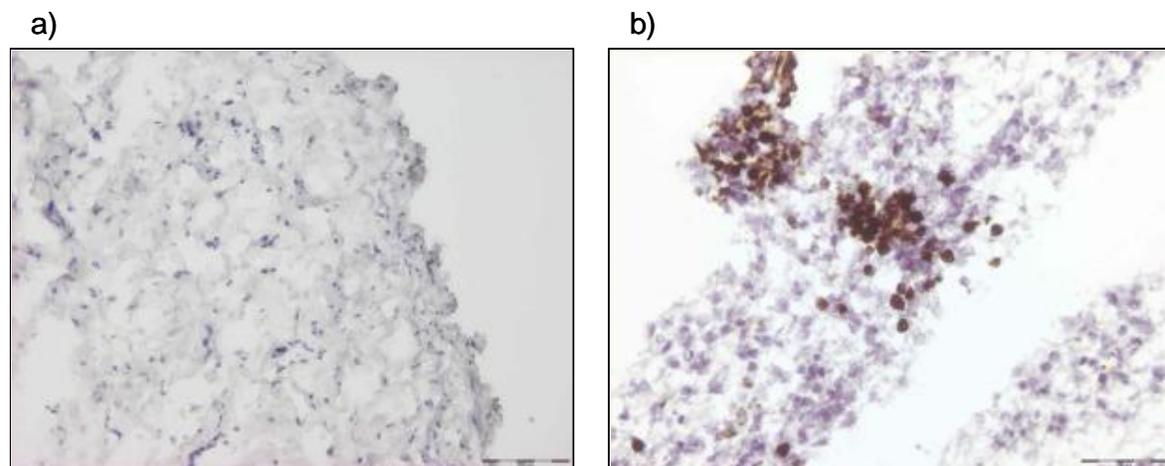
In den immunhistologischen Färbungen der Gefrierschnitte beider Autotransplantate waren im Bereich der *Tunica media* Desmin-positive Zellen zu erkennen. Diese lagen parallel zur luminalen Oberfläche in geordneter fibrillärer Ausrichtung (s. Abb. 30 b).

#### 4.6.1.2.3. Leukozytennachweis

Der immunhistochemische Leukozytennachweis mit CD11b war für beide Autotransplantate negativ, es konnten keine positiven Zellen innerhalb der Gefäßwand oder des Segels beobachtet werden. Als Positiv-Kontrolle dienten Gefrierschnitte von nativer oviner Milz.

#### 4.6.1.2.4. Prokollagen Typ I Synthese

Die Synthese von Prokollagen Typ I, als Vorstufe von Kollagen Typ I, wurde mit Hilfe des M38-Proteins immunhistochemisch nachgewiesen. Im Gegensatz zu den nativen Kontrollen waren die beiden Autotransplantate über alle drei Schichtungen der Gefäßwand gleichmäßig positiv (s. Abb. 31).

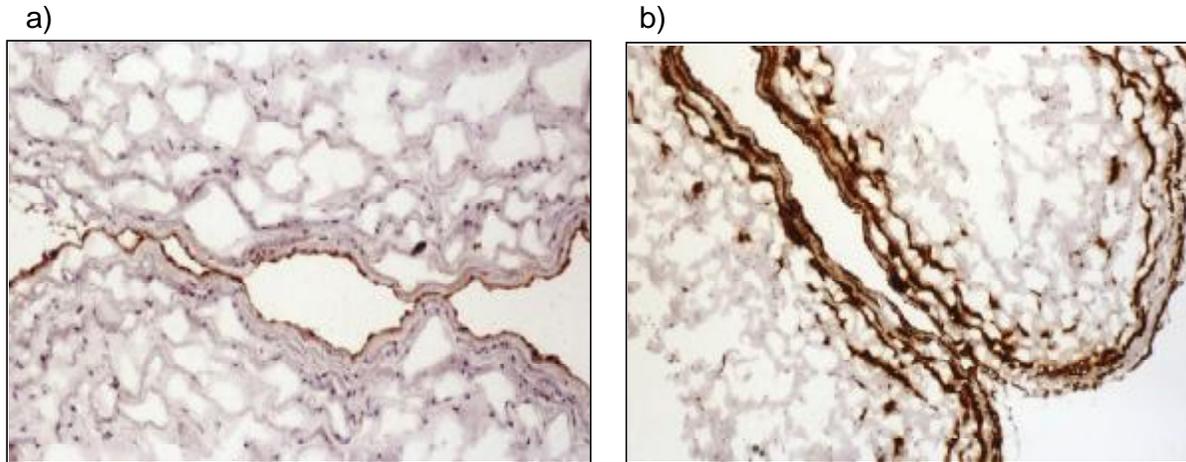


**Abb. 29: Leukozytennachweis mit CD11 b an den Gefrierschnitten der Autotransplantate und einer ovinen Milz- Kontrolle**

*Positive Zellen zeigen eine braune Färbung, negative entsprechend der Gegenfärbung eine Blaue.*

*a) Autotransplantat, 100x Vergrößerung*

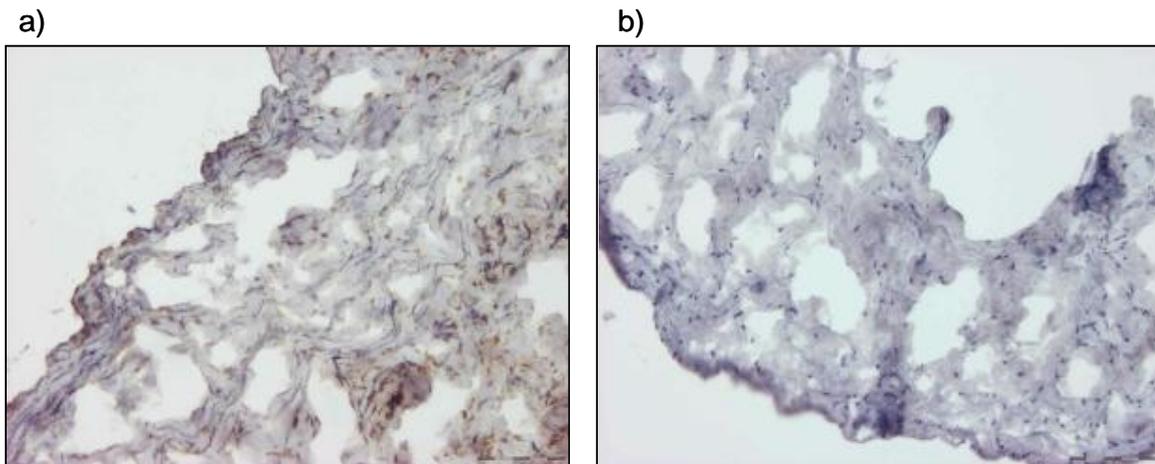
*b) ovine Milz als Positiv-Kontrolle, 200x Vergrößerung*



**Abb. 30: Immunhistochemische Charakterisierung der Endothel- und glatten Muskelzellen der Autotransplantate. 100x Vergrößerung**

*Positive Zellen zeigen eine braune Färbung, negative entsprechend der Gegenfärbung eine Blaue.*

- a) vWillebrand-Faktor*
- b) anti Desmin*



**Abb. 31: Prokollagen Typ I- Markierung eines Autotransplantates im Vergleich mit einer nativen ovinen Vene mit M38. 100x Vergrößerung**

*Positive Zellen zeigen eine braune Färbung, negative entsprechend der Gegenfärbung eine Blaue.*

*In Intima, Media und Adventita des Autotransplantates konnten positive Areale beobachtet werden (a). Im Vergleich dazu war die gesamte Gefäßwand der nativen Kontrolle negativ (b).*

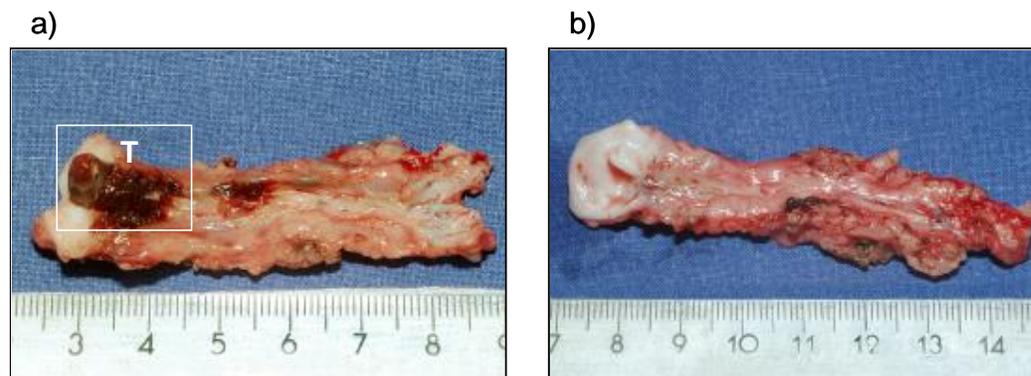
#### 4.6.2. Auswertung der azellulär implantierten Venensegmente

Um festzustellen, ob eine Rebesiedlung von klappentragenden Venensegmenten vor Implantation für eine Funktionalität *in vivo* zwingend erforderlich ist, wurden dezellularisierte Segmente allogene implantiert.

Dezellularisierte klappentragende Venensegmente wurden für 1 (n=4) und 6 Wochen (n=6) in Jugularvenen-Position in weibliche Schafe implantiert. Kurz vor der Implantation wurde die Klappensuffizienz eines jeden Segmentes anhand einer Perfusion mit PBS überprüft.

##### 4.6.2.1. Explantation

Sowohl nach 1 als auch nach 6 Wochen war keine der implantierten Venenklappen noch suffizient, das heißt, es war kein Schließen der Klappen bei Perfusion mit PBS erkennbar. Nach Aufschneiden der Segmente konnten die Segel makroskopisch nicht identifiziert werden. Die Lumina erschienen stark verengt und zum Teil verwachsen. Nach 6 Wochen war keine der implantierten Venen mehr durchgängig, proximal der herzfernen Anastomose (Nahtstelle) hatten sich zahlreiche neue Kollateralgefäße ausgebildet. Die implantierten Gefäße waren durchgehend thrombosiert (s. Abb. 32 a).



**Abb. 32:** Azellulär implantierte klappentragende Venensegmente – luminale Ansicht der Explantate.

Nach Explantation der implantierten Segmente wurden sie der Länge nach aufgeschnitten und das Lumen fotografiert.

a) Explantat nach 1 Woche Implantation – es waren keine Venenklappensegel mehr zu erkennen. Im Lumen befand sich ein frischer Thrombus (T).

b) Explantat nach 6 Wochen Implantation – nach Entfernen des Thrombus waren ebenfalls makroskopisch keine Venenklappensegel mehr zu erkennen.

---

#### **4.6.2.2. Übersichtsfärbungen der azellulär implantierten Explantate**

##### **4.6.2.2.1. Hämalau und Eosin Färbung**

In der mikroskopischen Auswertung der Hämalau und Eosin (H&E)-Färbung konnten in der Gruppe der 1 Wochen Tiere in 2 von 4 Proben Venenklappensegel detektiert werden (s. Abb. 33 a und Tab. 9). Nach 6 Wochen Implantation konnte jedoch in keinem der 6 Segmente mehr eine Segelstruktur nachgewiesen werden. Sowohl nach 1 als auch nach 6 Wochen waren luminaire und interstitielle Zellen (in der H&E- Färbung blau dargestellt, s. Abb. 33) in allen Schnitten zu erkennen. Es kam also zu einer Rebesiedlung der dezellularisierten Strukturen *in vivo*.

##### **4.6.2.2.2. Elastika van Gieson-Färbung**

In der Elastika van Gieson-Färbung der Explantate konnten in den 1 Wochen-Proben thrombotische Auflagerungen über die gesamte luminaire Oberfläche aller 4 Segmente beobachtet werden. Diese stellten sich in der mikroskopischen Auswertung gelb dar (s. Abb. 34 a und b). Nach 6 Wochen Implantation konnten diese gelblichen Auflagerungen nur noch in 2 von 6 Fällen beobachtet werden (Explantate 7 und 8, s. Tab. 9). In allen Explantaten waren nach 6 Wochen über die gesamte luminaire Oberfläche neue kollagene Matrixstrukturen zu erkennen, die sich in der Elastika van Gieson- Färbung rosa darstellten (s. Abb. 34 c). Diese „Neo- Intima“ war in den Venensegmenten, die nur 1 Woche implantiert waren, nicht zu erkennen. In den Explantaten 7 und 8 (s. Tabelle 9) zeigte sich sowohl eine Neo- Intima als auch Stellen mit thrombotischen Auflagerungen. Bei starker Vergrößerung dieser gelben Auflagerungen waren Zellen zu erkennen, die nicht durch die Kernfärbung markiert worden sind. Es handelte sich bei diesen Zellen um Erythrozyten, da diese keinen Zellkern besitzen.

##### **4.6.2.3. Kalzifizierungsnachweis nach „von Kossa“**

In der Versilberungsmethode nach „von Kossa“ stellen sich kalkhaltige Areale braunschwarz gefärbt dar. Vereinzelt kleine Stellen beginnender Kalzifizierung konnte in 2 von 4 Explantaten nach 1 Woche Implantation beobachtet werden (s. Tab. 9, Explantate 1 und 4,). Nach 6 Wochen Implantation wiesen alle Explantate entweder punktuelle (s. Tab. 9, Proben 7, 8 und 9) oder größere kalzifizierte Areale auf (s. Tab. 9, Proben 5, 6 und 10).

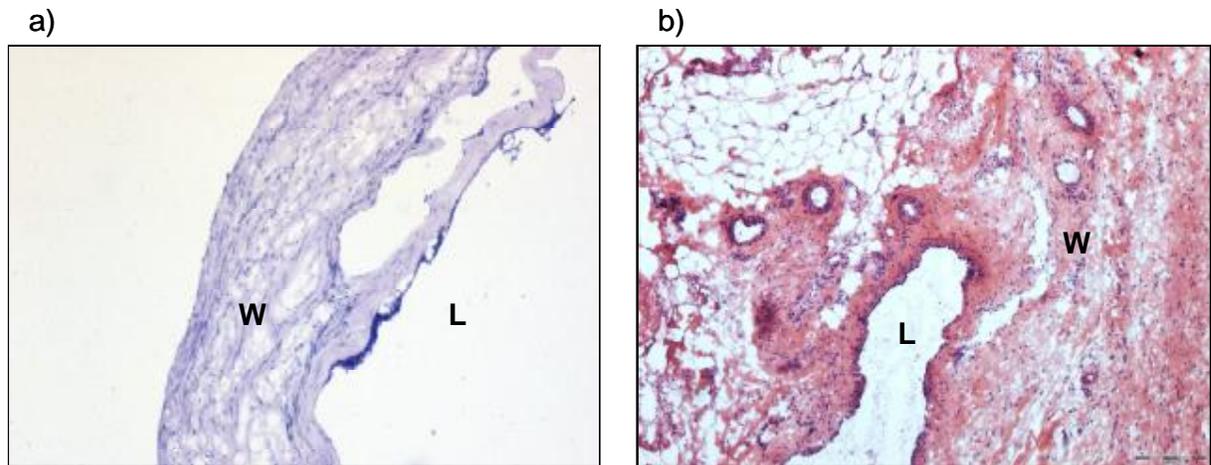
**Tabelle 9: Übersichtsfärbungen der azellulär implantierten Venensegmente nach der Explantation:**

Explantate	H&E		Elastika van Gieson		von Kossa Kalzifizierung
	<i>in vivo</i> Rebesiedlung	Segel erkennbar	Thrombotische Auflagerungen	Bildung einer Neointima	
1	+	+	+	-	+
2	+	-	+	-	-
3	+	+	+	-	-
4	+	-	+	-	+
5	+	-	-	+	++
6	+	-	-	+	++
7	+	-	+	+	+
8	+	-	+	+	+
9	+	-	-	+	+
10	+	-	-	+	++

Explantate 1-4: 1 Woche implantiert

Explantate 5-10: 6 Wochen implantiert

<u>H&amp;E- Färbung:</u>	Rebesiedlung <i>in vivo</i>	+
	keine Rebesiedlung <i>in vivo</i>	-
<u>Elastika van Gieson:</u>	Thrombozytenauflagerung	+
	keine Thrombozyten zu erkennen	-
	Neubildung von Kollagen <i>in vivo</i>	+
	keine zusätzlichen Kollagenschichten	-
<u>von Kossa:</u>	Kalzifizierung punktuell	+
	kalzifizierte Areale	++
	nicht kalzifiziert	-



**Abb. 33:** *H&E-Färbung azellulär implantierter Venensegmente nach der Explantation.*

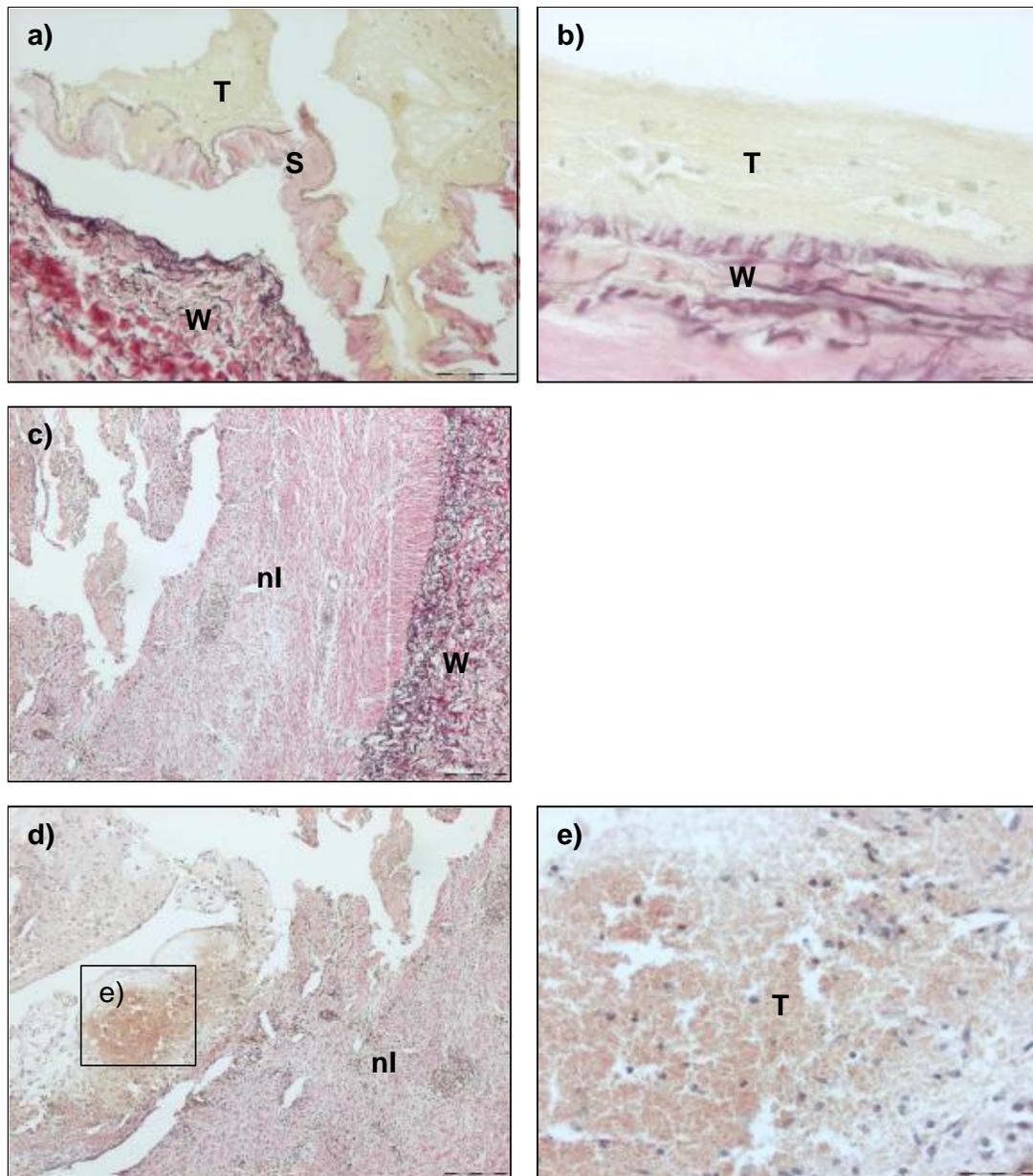
*a) 1 Woche implantiert, 40x Vergrößerung*

*b) 6 Wochen implantiert, 100x Vergrößerung*

*W = Wandbereich*

*L = Lumen*

*Sowohl nach 1 als auch nach 6 Wochen sind luminal aufgelagerte Zellen und interstitielle Zellen in der Venenwand zu erkennen.*



**Abb. 34: Elastika van Gieson-Färbung der azellulären Explantate nach 1 und 6 Wochen.**

a) 200x Vergrößerung und b) 400x Vergrößerung, 1 Woche implantiert

c) 100x Vergrößerung, d) 100x Vergrößerung und e) 400x Vergrößerung, 6 Wochen implantiert

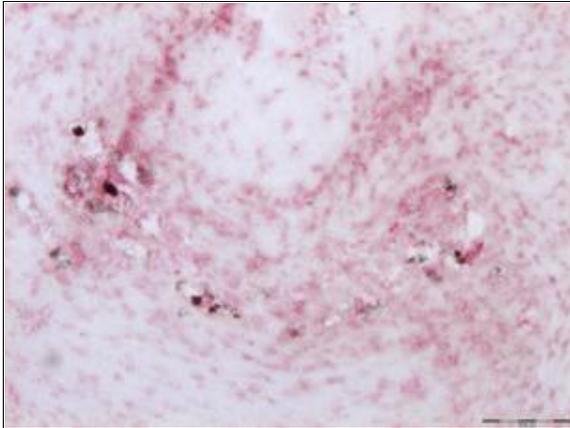
e) Ausschnitt vergrößert aus d); Es sind Zellen (gelb) zu erkennen, die keinen Zellkern besitzen, bei diesen Zellen handelt es sich um Erythrozyten.

T = Thrombotische Auflagerungen

W = Wand des ursprünglich implantierten Segmentes

S = Venenklappensegel

nl = in vivo neugebildetes kollagenes Bindegewebe (Neo-Intima)



**Abb. 35: von Kossa- Färbung eines azellulär implantierten Segmentes – Kalzifizierungsnachweis. 200x Vergrößerung**

*Die Abbildung zeigt einen Schnitt durch die Venenwand eines für 6 Wochen azellulär implantierten Segmentes. In der Versilberungsmethode nach von Kossa erscheinen kalkhaltige Areale braun-schwarz gefärbt. Zellkerne und Matrix sind rot gegengefärbt mit Kernechtrot.*

#### **4.6.2.4. Immunhistochemische Auswertung der azellulär implantierten Venensegmente**

##### **4.6.2.4.1. Endothelzellen**

Sowohl nach 1 als auch nach 6 Wochen Implantation im Schaf wiesen alle Explantate eine konfluente Endothelzellschicht auf (s. Abb. 36 a). Zusätzlich zeigten 3 von 4 Explantaten nach 1 Woche Implantation eine leichte Vaskularisierung im Venenwandgewebe (s. Abb. 36 b), während nach 6 Wochen 5 von 6 Proben eine starke Vaskularisierung im Vergleich zu nativem ovinen Venenwandgewebe aufwiesen.

##### **4.6.2.4.2. Glatte Muskelzellen**

Glatte Muskelzellen wurden mit anti-Desmin immunhistochemisch detektiert. Nach 1 Woche Implantation der dezellularisierten Venensegmente konnten jedoch keine glatten Muskelzellen im Gewebe nachgewiesen werden. Erst nach 6 Wochen Implantation waren in allen 6 Proben glatte Muskelzellen zu finden, und zwar in den Bereichen der *in vivo* neugebildeten Neo-Intima. Die Zellen lagen einzeln und unausgerichtet in der extrazellulären Matrix und zeigten nicht die geordneten fibrillären Ausrichtungen glatter Muskelzellen, die in nativem Wandgewebe zu finden ist (s. Abb. 36 c). Außerdem zeigten sie eine unphysiologische Hyperproliferation der intestitieller Zellen

#### **4.6.2.4.3. Leukozytennachweis**

Inflammatorische Reaktionen im Venenwandgewebe wurden durch Leukozytenmarkierung mit einem anti-CD11b-Antikörper dargestellt. Sowohl nach 1 als auch nach 6 Wochen Implantation der dezellularisierten Segmente im Schaf konnten vereinzelte bis viele Leukozyten im Wandbereich nachgewiesen werden (s. Abb. 36 d und Tab. 10). Die 6-Wochen-Proben zeigten jedoch insgesamt eine schwächere Einwanderung von Leukozyten. Hier zeigten nur 2 Explantate eine starke Immigration von Leukozyten (s. Tab. 10, Proben 5 und 8), während nach 1 Woche 3 von 4 Tieren eine Vielzahl von inflammatorischen Zellen aufwiesen (s. Tab. 10, Proben 1, 3, und 4).

#### **4.6.2.4.4. Prokollagen Typ I Synthese**

Nach 1 Woche Implantation konnte in keiner der 4 Proben Prokollagen Typ I nachgewiesen werden. Nach 6 Wochen Implantation war jedoch in allen Explantaten Prokollagen Typ I zu finden, und zwar sowohl in den ursprünglich implantierten Strukturen, als auch in den Formationen der Neo-Intima (s. Tab. 10, Explantate 5-10). In der Neo-Intima war das Vorhandensein des Prokollagens deutlich stärker als in den Venenwandbereichen (s. Abb. 36 e).

**Tabelle 10: Immunhistochemische Charakterisierung der azellulär implantierten Venenklappensegmente nach der Explantation:**

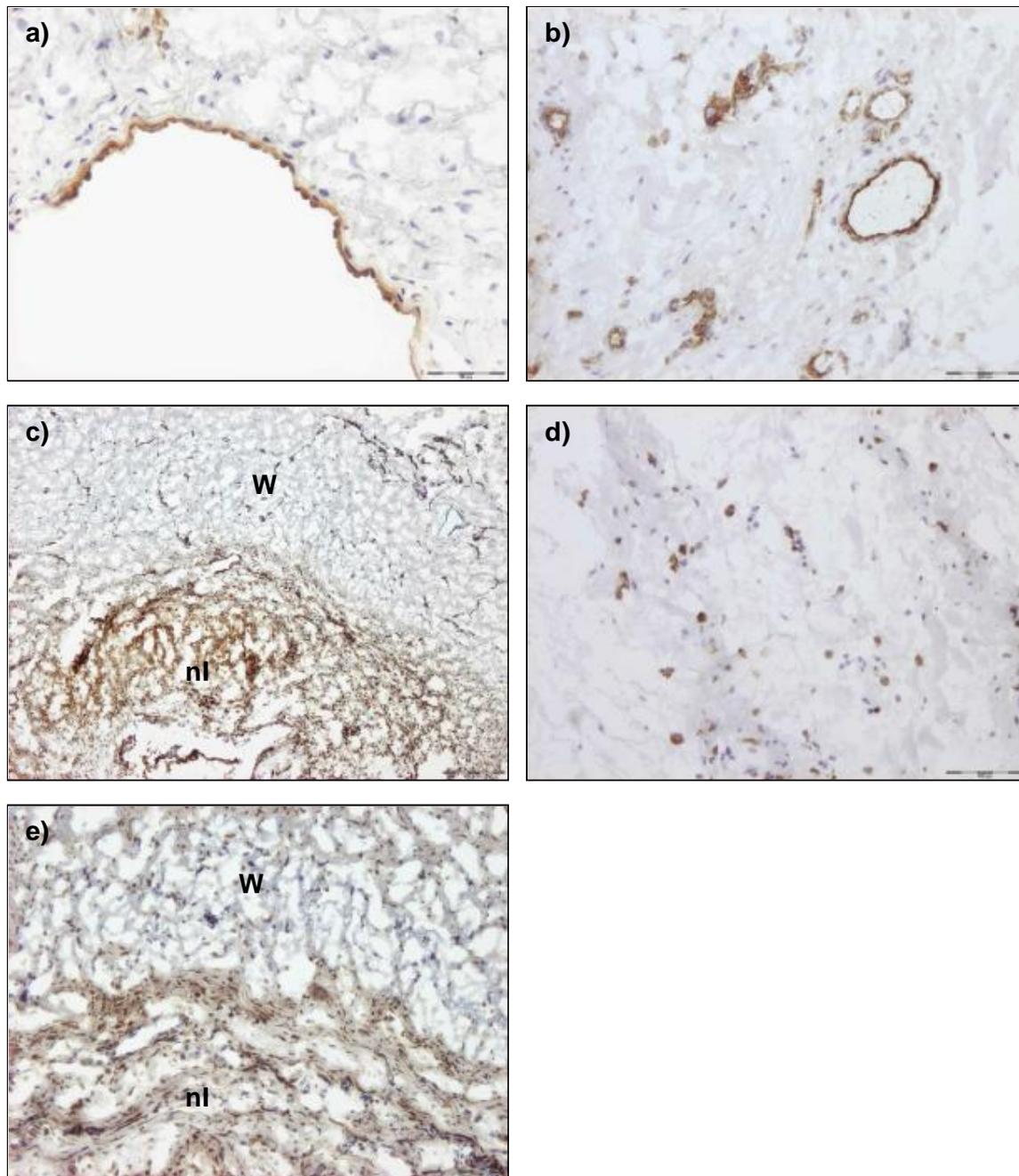
Explantate	von Willebrand- Faktor		Desmin	CD 11b	M 38
	Endothel	Vaskularisierung			
1	+	+	-	++	-
2	+	+	-	+	-
3	+	+	-	++	-
4	+	-	-	++	-
5	+	++	nI+	++	+/+
6	+	++	nI+	+	+/+
7	+	+	nI+	+	+/+
8	+	++	nI+	++	+/+
9	+	++	nI+	+	+/+
10	+	++	nI+	+	+/+

Explantate 1-4: 1 Woche implantiert

Explantate 5-10: 6 \_Wochen implantiert

<u>von Willebrand- Faktor:</u>	Endothel konfluent	+
	teilweise Endothelbeschichtet	+/-
	keine Endothelbeschichtung	-
	Vaskularisierung	+
	keine Vaskularisierung	-
	starke Vaskularisierung	++
<u>Desmin:</u>	glatte Muskelzellen in der Media	+
	glatte Muskelzellen in nI	nI+
	keine glatten Muskelzellen	-
<u>CD 11b:</u>	vereinzelt Leukozyten im Gewebe	+
	viele Leukozyten im Gewebe	++
	keine Leukozyten	-
<u>M 38:</u>	neu synthetisiertes Prokollagen I:	
	in der ursprünglichen Matrix	+
	in der Neointima	nI+
	in beiden Gewebetypen	+/+
	kein Prokollagen I	-

nI = *in vivo* neugebildetes kollagenes Bindegewebe (Neo-Intima)



**Abb. 36: Immunhistochemische Charakterisierung azellulär implantierter Venensegmente nach der Explantation.**

Positive Zellen zeigen eine braune Färbung, negative entsprechend der Gegenfärbung eine Blaue.

a) und b) 1 Woche implantiert, anti von Willebrand- Faktor, 200x Vergrößerung

c) 4 Wochen implantiert, anti Desmin, 100x Vergrößerung

d) 4 Wochen implantiert, CD 11b, 200x Vergrößerung

e) 4 Wochen implantiert, M 38 Protein, 200x Vergrößerung

W = ursprünglich implantiertes Wandgewebe

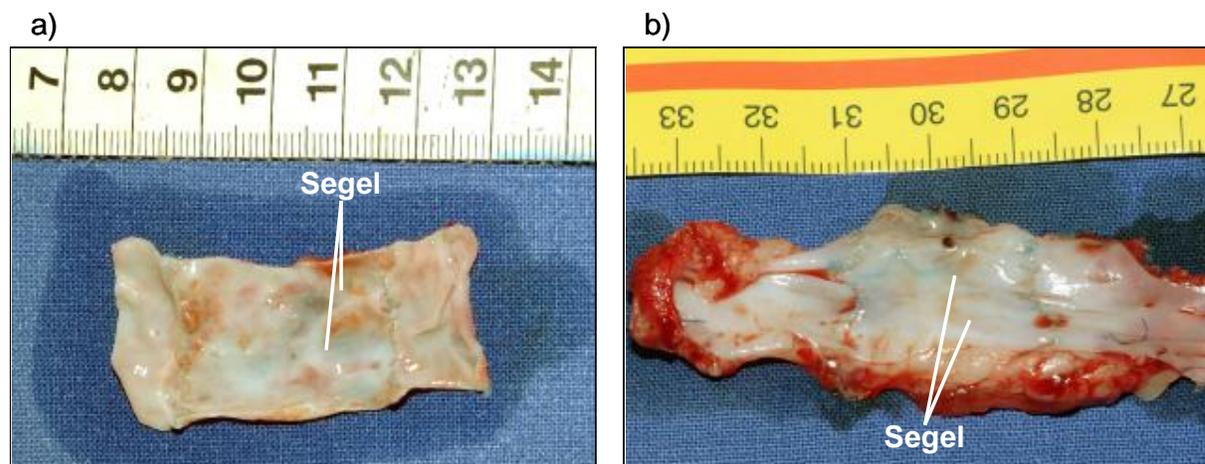
nl = in vivo neugebildetes kollagenes Bindegewebe (Neo-Intima)

#### 4.6.3. Auswertung der *in vitro* rebesiedelten Venensegmente nach Implantation

*In vitro* autolog rebesiedelte klappentragende Venensegmente wurden für 1 (n=4) und 6 Wochen (n=7) in Jugularvenen-Position in die jeweiligen weiblichen Zellspender-Schafe implantiert. Kurz vor der Implantation wurde die Klappensuffizienz eines jeden Segmentes anhand einer Perfusion mit PBS überprüft.

##### 4.6.3.1. Explantation

Nach 1 Woche waren noch alle 4 implantierten Venenklappen suffizient, das heißt, es war ein Schließen der Klappen bei Perfusion mit PBS direkt nach der Explantation erkennbar. Nach Aufschneiden der Segmente konnten die Segel makroskopisch erkannt und mit einer Pinzette angehoben werden. In dieser Ansicht konnten kleine Thromben an den Kommissuren und im Sinus der Venenklappensegel beobachtet werden (s. Abb. 37 a). Nach 6 Wochen Implantation waren alle Venenklappen insuffizient. Makroskopisch waren nur noch 4 von 7 Venenklappen nach Aufschneiden der explantierten Venen zu erkennen (s. Abb. 37 b). Von diesen Klappen ließen sich die Segel nicht mehr mit einer Pinzette von der Venenwand lösen. 3 implantierte Venensegmente waren nach 6 Wochen über die gesamte luminale Oberfläche thrombosiert.



**Abb. 37:** *In vitro* rebesiedelte implantierte klappentragende Venensegmente – luminale Ansicht der Explantate.

a) Explantat nach 1 Woche Implantation. Die Venenklappensegel sind gut zu erkennen, an deren Kommissuren sind jedoch kleine Thromben zu sehen.

b) Explantat nach 6 Wochen Implantation. Die Venenklappensegel sind makroskopisch kaum noch zu erkennen. Frische Thromben sind nicht vorhanden.

### **4.6.3.2. Übersichtsfärbungen der *in vitro* rebesiedelten Segmente nach Implantation**

#### **4.6.3.2.1. Hämalau und Eosin-Färbung**

In der H&E-Färbung konnten in allen Explantaten sowohl luminale als auch interstitielle Zellen detektiert werden. Die Venenklappensegel der 1-Wochen-Tiere waren deutlich zu erkennen (s. Abb. 38 a), wohingegen nach 6 Wochen die Segel in die extrazelluläre Matrix der Neo-Intima eingebettet, und so nur schwer wiederzufinden waren (s. Abb. 38 b).

#### **4.6.3.2.2. Elastika van Gieson**

In der Elastika van Gieson-Färbung der Venenklappenexplantate konnten nach 1 Woche Implantation kleinere thrombotische Auflagerungen mit agglutinierten Erythrozyten an allen Segelkommissuren beobachtet werden, während jedoch die luminalen Wandbereiche frei von diesen Auflagerungen waren. Neue kollagene Strukturen luminal der ursprünglich implantierten Venenwand und Segel (Bildung einer Neo-Intima *in vivo*) konnten nicht nachgewiesen werden.

Nach 6 Wochen Implantation waren auf 4 von 7 explantierten Segmenten thrombotische Auflagerungen weder im Segel-noch im luminalen Wandbereich zu beobachten (s. Tab. 11, Explantate 5-8). Bei diesen Proben war auch keine Neo-Intimabildung in den Wandbereichen festzustellen. Die restlichen 3 Explantate zeigten jedoch verstärkt thrombotische Auflagerungen sowohl im Segel- als auch im Wandbereich (s. Tabelle 11., Explantate 9-11). Alle Venenklappensegel der 7 Explantate waren in kollagene Strukturen einer *in vivo* gebildeten Neo-Intima eingebettet (s. Abb. 39 b).

#### **4.6.3.3. Kalzifizierungsnachweis**

Weder nach 1 noch nach 6 Wochen Implantation kam es zu Kalzifizierungen der implantierten Gewebeselemente. Es konnte in den Schnitten nur die rötliche Gegenfärbung der Kernechtrot-Färbung beobachtet werden (s. Abb. 40).

**Tabelle 11: Übersichtsfärbungen der *in vitro* rebesiedelten Segmente nach Implantation:**

Explantate	H&E		Elastika van Gieson				„von Kossa“ Kalzifizierung
	luminaler Monolayer	interstitielle Zellen	Thrombozyten Auflagerung		Neubildung von Kollagen <i>in vivo</i>		
			W	S	W	S	
1	+	+	-	+	-	-	-
2	+	+	-	+	-	-	-
3	+	+	-	+	-	-	-
4	+	+	-	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-	+	-
6	+	+	-	-	-	+	-
7	+	+	-	-	-	+	-
8	+	+	-	-	-	+	-
9	+	+	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	+	+	-

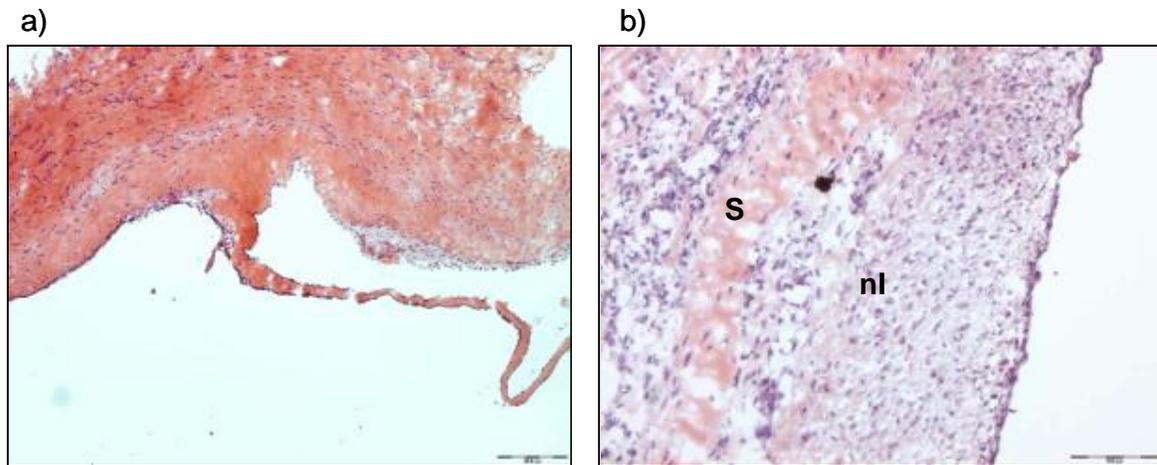
Explantate 1-4: 1 Woche implantiert

Explantate 5-11: 6 Wochen implantiert

W = Wandbereich

S = Segelbereich

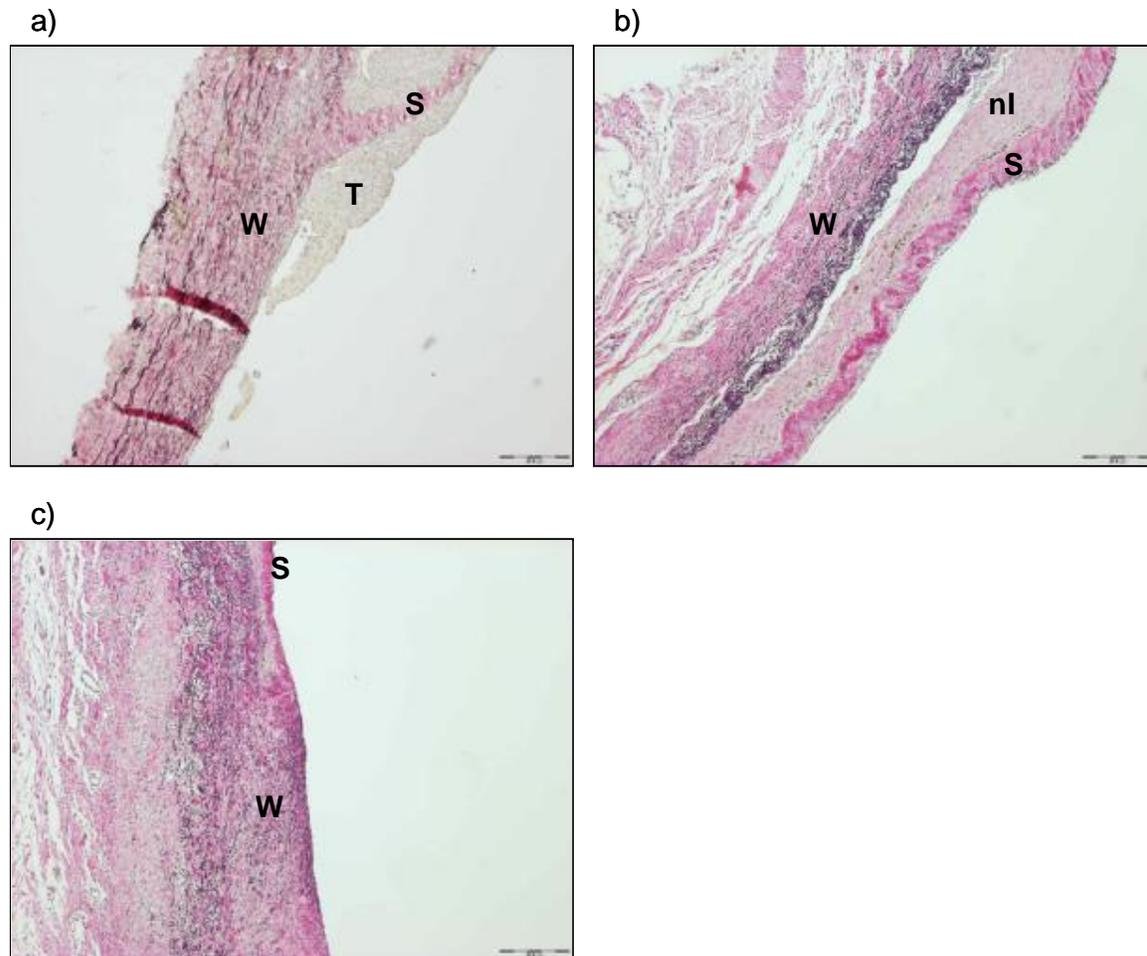
<u>H&amp;E- Färbung:</u>	luminaler Zell-Monolayer	+
	luminale Zellen nicht konfluent	0
	keine luminalen Zellen erkennbar	-
	interstitielle Zellen vorhanden	+
	nur wenige interstitielle Zellen vorhanden	0
	keine interstitiellen Zellen erkennbar	-
<u>Elastika van Gieson:</u>	Thrombozytenauflagerung	+
	keine Thrombozyten zu erkennen	-
	Neubildung von Kollagen <i>in vivo</i>	+
	keine zusätzlichen luminalen Kollagenschichten	-
<u>von Kossa:</u>	Kalzifizierung punktuell	+
	kalzifizierte Areale	++
	nicht kalzifiziert	-



**Abb. 38:** *H&E-Färbung der in vitro rebesiedelten Explantate nach 1 und 6 Wochen Implantation*

*a) 1 Woche implantiert, 40x Vergrößerung. Das Segel der Venenklappe ist deutlich zu erkennen.*

*b) 6 Wochen implantiert, 200x Vergrößerung. Das Segel ist in die in vivo neugebildete Neo-Intima (nl) eingebettet.*



**Abb. 39:** *Elastika van Gieson-Färbung der in vitro rebesiedelten Explantate nach 1 und 6*

***Wochen Implantation***

*W = ursprünglich implantierte Venenwand*

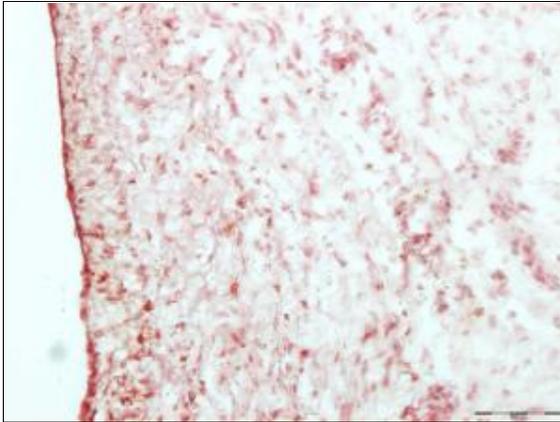
*S = Venenklappensegel*

*T = thrombotische Auflagerungen*

*nl = in vivo neugebildetes kollagenes Bindegewebe (Neo-Intima)*

*a) 1 Woche Implantation, 40x Vergrößerung*

*b) und c) 6 Wochen implantiert, 40x Vergrößerung*



**Abb. 40: Von Kossa-Färbung eines *in vitro* rebesiedelten Explantates nach 6 Wochen Implantation – Kalzifizierungsnachweis. 200x Vergrößerung**

*Nach 6 Wochen Implantation sind keine schwarz-braunen Areale, die eine beginnende Kalzifizierung bedeuten würde, im Gewebe zu erkennen.*

#### **4.6.4. Immunhistochemische Charakterisierung *in vitro* rebesiedelter implantierter Venenklappensegmente nach Explantation**

##### **4.6.4.1. Endothelzellen**

Alle Explantate nach 1 und 6 Wochen Implantation zeigten in der immunhistochemischen Charakterisierung mit anti von Willebrand-Faktor ein durchgängiges, einschichtiges Endothel (s. Abb. 41 a). 2 von 4 Segmenten zeigten nach 1 Woche keine, die anderen beiden Segmente eine leichte Vaskularisierung. Nach 6 Wochen waren 6 von 7 Segmenten stark vaskularisiert, in einem Segment waren nur leichte Gefäßeinsprossungen zu beobachten, die einer normalen, nativen Vaskularisierung entsprach (s. Tab. 12).

##### **4.6.4.2. Glatte Muskelzellen**

Glatte Muskelzellen konnten nach 1 Woche in allen implantierten Segmenten deutlich im Bereich der *Tunica media*, immunhistochemisch mit anti Desmin dargestellt werden (s. Abb. 41 b). Sie zeigten die für sie typische faserige Ausrichtung und Verteilung parallel zur *Tunica intima*. Nach 6 Wochen *in vivo* waren glatte Muskelzellen bei den Explantaten 5 bis 8 (s. Tab. 12) ebenfalls in geordneten Strukturen in der Media der ursprünglichen implantierten Wandbereichen zu finden. In den Bereichen, in denen sich *in vivo* eine Neo- Intima gebildet hat (s. Tab. 12, Segelbereiche der Explantate 5-11, Wandbereiche der Explantate 8-11), waren glatte Muskelzellen hauptsächlich in diesen neusynthetisierten Regionen zu finden, während

in der ursprünglich implantierten Venenwand bei diesen Proben kaum noch glatte Muskelzellen nachgewiesen werden konnten.

#### **4.6.4.3. Leukozytennachweis**

Der Nachweis von in das Gewebe immigrierter Leukozyten über eine immunhistochemische Charakterisierung mit CD11b war für alle Segmente nach 1 Woche Implantation negativ. Hier konnten keine Leukozyten in den Wand und Segelbereichen beobachtet werden. Nach 6 Wochen waren in 3 von 7 Segmenten (s. Tab. 12, Explantate 8-11) vereinzelt Leukozyten in der Venenwand zu erkennen, die verbleibenden 4 Explantate (5-8, s. Tab. 12) waren frei von eingewanderten Leukozyten.

#### **4.6.4.4. Prokollagen I Synthese**

Alle Explantate zeigten sowohl nach 1 als auch nach 6 Wochen positive Bereiche für die immunhistochemische Markierung mit M-38-Protein in den ursprünglich implantierten Wandbereichen (s. Abb. e und Tab. 12). Nach 6 Wochen war zusätzlich ein Synthese von Prokollagen 1 in den *in vivo* gebildeten Regionen der Neo-Intima zu beobachten. Hier war das Vorhandensein von Prokollagen 1 wesentlich stärker als in den ursprünglich implantierten Venenwandbereichen (s. Tab. 12).

**Tabelle 12: Immunhistochemische Charakterisierung der *in vitro* rebesiedelten implantierten Venenklappensegmente nach der Explantation:**

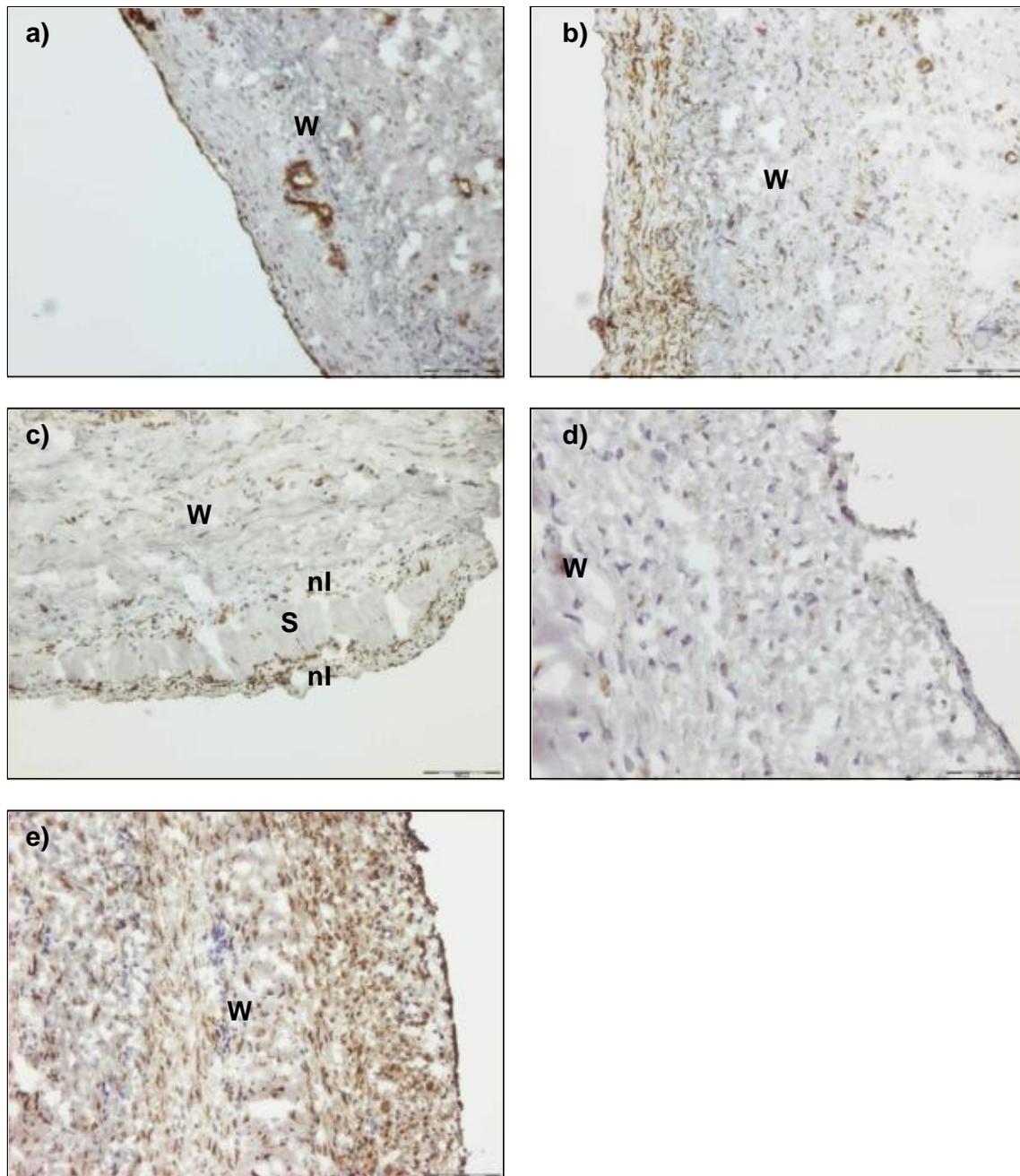
Explantate	von Willebrand- Faktor		Desmin	CD 11b	M 38
	Endothel	Vaskularisierung			
1	+	-	+	-	+
2	+	-	+	-	+
3	+	+	+	-	+
4	+	+	+	-	+
5	+	++	nI+/+	-	nI+/+
6	+	++	nI+/+	-	nI+/+
7	+	+	nI+/+	-	nI+/+
8	+	++	nI+/+	-	nI+/+
9	+	++	nI+	+	nI+/+
10	+	++	nI+	+	nI+/+
11	+	++	nI+	+	nI+/+

Explantate 1-4: 1 Woche implantiert

Explantate 5-11: 6 Wochen implantiert

<u>von Willebrand- Faktor:</u>	Endothel konfluent	+
	teilweise Endothelbeschichtet	+/-
	keine Endothelbeschichtung	-
	Vaskularisierung	+
	keine Vaskularisierung	-
	starke Vaskularisierung	++
<u>Desmin:</u>	glatte Muskelzellen in der Media	+
	glatte Muskelzellen in nI	nI+
	glatte Muskelzellen in Media und nI	nI+/+
	keine glatten Muskelzellen	-
<u>CD 11b:</u>	vereinzelte Leukozyten im Gewebe	+
	viele Leukozyten im Gewebe	++
	keine Leukozyten	-
<u>M 38:</u>	<u>neu synthetisiertes Prokollagen I:</u>	
	in der ursprünglichen Matrix	+
	in nI	nI+
	in beiden Gewebetypen	nI+/+
	kein Prokollagen I	-

nI = *in vivo* neugebildetes kollagenes Bindegewebe (Neo-Intima)



**Abb. 41: Immunhistochemische Charakterisierung der *in vitro* rebesiedelten Explantate nach 6 Wochen Implantation.**

a) von Willebrand- Faktor, 100x Vergrößerung

b) und c) Desmin, 100x Vergrößerung

d) CD11b, 200x Vergrößerung

e) M38- Protein, Prokollagen I Markierung, 100x Vergrößerung

W = ursprünglich implantierte Venenwand

S = Venenklappensegel

nl = *in vivo* neugebildetes kollagenes Bindegewebe (Neo-Intima)

---

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Tissue Engineering

Die Entwicklung unterschiedlicher Gewebe- und Organersatzsysteme unter Verwendung von Methoden des Tissue Engineering hat sich in den letzten 10 Jahren stark weiterentwickelt. Es wurden vielfältige Versuchsansätze *in vitro*, aber auch in Form von präklinischen Studien durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen wird davon ausgegangen, dass die *in vitro* Herstellung funktionsfähiger biologischer Prothesen möglich ist. Realisiert werden soll diese Herstellung durch eine *in vitro* Kokultivierung verschiedener Zelltypen auf einer dreidimensionalen Trägerstruktur (Matrix). Im Idealfall besteht diese aus allen essentiellen Bausteinen der extrazellulären Matrix (ECM). Ein weiterer Fokus im Tissue Engineering liegt in der Verwendung autologer Zellen, um Probleme wie Abstoßung und hochdosierte, lebenslange Immunsuppression nach Implantation zu vermeiden. Bei der Auswahl der Kriterien zur *in vitro*- Population dreidimensionaler Trägerstrukturen ist das Matrixremodeling (Umbau der „alten“ Matrixstrukturen in autologe Strukturen) ein Schwerpunkt im Tissue Engineering. Der physiologisch zelluläre Umbauprozess extrazellulärer Matrixkomponenten ist auch *in vivo* ein wesentliches Kriterium von funktionellem Gewebe. Angestrebtes Ziel ist die Herstellung einer bioartifiziellen Prothese, die sich in der Zusammensetzung nicht vom natürlichen (nativen) Gewebe unterscheidet. Die *in vitro* begonnenen physiologischen Prozesse sollen sich nach Implantation in den Empfänger weiter fortsetzen, bis schließlich alle gewebetypspezifischen Funktionen lebenslang ermöglicht werden können.

### 5.2. Kardiovaskuläres Tissue Engineering

Das prinzipielle Konzept der bioartifiziellen Herstellung von kardiovaskulären Prothesen ist die Verwendung vorgeformter Strukturgerüste, die *in vitro* mit Endothelzellen und/oder Myofibroblasten besiedelt werden (Bell 1995). Die ideale Matrix für artifiziell hergestellte kardiovaskuläre Prothesen mittels Tissue Engineering ist bis heute nicht eindeutig definiert. Verwendet werden zum einen synthetische Polymer- als auch biologische Trägerstrukturen, die aus unterschiedlich vielen ECM- Komponenten zusammengesetzt sind (Stock und Vacanti, 2001).

Im Bereich der synthetischen Polymermatrices wurden anfangs ausschließlich vom menschlichen Organismus nicht abbaubare Materialien, wie z.B. PTFE verwendet. Diese lassen aber einen Umbau der Matrix nicht zu, also auch keine Neusynthese von Elastin und

Kollagen. Sie besitzen daher keine vasomotorischen Fähigkeiten und neigen zur Occlusion (Verschluss) durch intimale Hyperplasie und Neo-Intimabildung (Nerem und Seliktar, 2001). Aus diesem Grund wurde dazu übergegangen, biodegradable, synthetische Polymerverbindungen als Gefäßprothesen zu verwenden (Shinoka et al., 1995 und 1997). Ein wesentlicher Nachteil der bis jetzt verwendeten biodegradierbaren Polymere ist, dass sich die extrazellulären Matrixkomponenten *in vivo*, also im Empfänger quantitativ stark verändern (Stock 2000 und Sodian 2000). Ein weiteres potentiell Problem dieser künstlichen Matrices ist das Fehlen wichtiger extrazellulärer Matrixproteine, wie z.B. Elastin oder Proteoglykane, die für die Verbindung der Matrix mit den zellulären Bestandteilen des Gewebekonstruktes verantwortlich sind (Cheresh 1989, Joshi 1993). Das Hauptproblem aller synthetischen Materialien ist jedoch deren starke thrombogene luminal Oberflächeneigenschaft.

Bedingt durch die aufgezählten Nachteile synthetischer Polymere haben sich viele Arbeitsgruppen auf den Einsatz biologischer Matrices für das Tissue Engineering spezialisiert.

Generell muss hierbei zwischen zwei unterschiedlichen Ansätzen unterschieden werden. Zum einen werden verschiedene Bausteine der extrazellulären Matrix zu einer neuen Trägerstruktur zusammengefügt (Hubbell, 1999). Die künstliche Synthese dieser Materialien ist orientiert an der natürlichen Zusammensetzung der ECM, erreicht jedoch nicht deren physikalische und räumliche Eigenschaften, wie z.B. der Verlauf und die Quervernetzung der kollagenen und elastischen Fasergeflechte. Zudem können solch filigrane Strukturen, wie sie im Segel einer Venenklappe vorkommen, technisch nicht umgesetzt werden (Schmidt und Baier, 2000).

Die Verwendung natürlich vorkommender Venenklappen, wie z.B. die Klappen aus der ovinen *Jugularis externa*, die nach Entnahme aus dem Spendertier dezellularisiert werden, überwinden diese Limitationen. Einerseits ist diese Matrix nicht nur vollständig aus allen ECM- Komponenten zusammengesetzt, sie besitzt zusätzlich die notwendigen Quervernetzungen der faserigen Komponenten. So ist sichergestellt, dass natürlich vorkommende und notwendige geometrische Verhältnisse gewährleistet sind. Andererseits entspricht die durch die Dezellularisierung erhaltene Segelstruktur denen natürlich vorkommender venöser Gefäße. Dies ist für die Funktionalität und die gleichbleibenden Strömungsverhältnisse des Blutes zwingend notwendig. Langzeittestungen zur Funktionalität von Herzklappensegeln bestätigen, dass die Geometrie sowohl die Degeneration als auch die Kalzifizierung, d.h. die dauerhafte Funktionalität der Klappe wesentlich bestimmt (Iyengar et

---

al., 2001 und Vesely, 2001). Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung tierischer Organe oder Organteile ist die nahezu unbegrenzter Verfügbarkeit.

### **5.3. Arbeitshypothese**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig *in vitro* Venenklappensegmente durch Methoden des Tissue Engineering hergestellt und auf ihre *in vitro* und *in vivo* Funktion getestet. Für diese Testungen wurde ein allogenes Tiermodell etabliert, welches die Untersuchungen *in vitro* hergestellter Venenklappensegmente möglich macht. Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine Rebesiedlung der Klappenstrukturen *in vitro* notwendig ist, oder ob azellulär implantierte Segmente durch *in vivo* Rebesiedlung Funktionalität erlangen.

### **5.4. Azellularisierung von klappentragenden Venensegmenten**

Bevor eine Rebesiedlung von klappentragenden venösen Kollagenstrukturen mit autologen Zellen *in vitro* durchgeführt werden konnte, musste zunächst eine Methode zur Dezellularisierung der allogenen Venenklappensegmente etabliert werden. Hierfür wurden 5 verschiedenen Methoden ausgewählt, die in früheren Arbeiten zur Dezellularisierung von Gewebe oder Organsystemen eingesetzt wurden (Schmidt und Baier, 2000). Für die Auswahl der optimalen Methode war es wichtig, dass nach dem Prozess der Zellentfernung keine Zellen mehr durch histologische Färbungen sichtbar gemacht werden konnten. In der Matrix verbleibende Spenderzellen würden im Empfänger zum einen eine Abstoßungsreaktionen der Segmente und zum anderen, zu Degeneration bedingt durch Kalzifizierung (Maxwell, 1989 und Huyn, 1999).

Die enzymatische Dezellularisierung mit Trypsin/ EDTA wurde ursprünglich für Herzklappen und Gefäße im porcinen System etabliert (Bader et al., 1996 und Steinhoff et al., 2000). Die Methode erstreckt sich über einen Zeitraum von 4 Tagen, wobei ein regelmäßiger Wechsel stattfindet zwischen Verdau und Herauslösen der Zellen. Diese Methode ließ sich jedoch nicht auf ovine Venenklappen übertragen, da sich nach der Histologie noch deutlich Zellen in allen drei Schichtungen der Venenwand zeigten. Die im Vergleich zu anderen Methoden lange Inkubationszeit in den verschiedenen Lösungen zur Dezellularisierung führte zu einer Degeneration der extrazellulären Matrix. Ebenfalls ohne Erfolg blieb die Dezellularisierungsmethode, bei der mit Hilfe zweier unterschiedlich konzentrierter Salzlösungen unter Bildung eines Gradienten die Zellen aus ihrem Verband herausgelöst werden sollten. Die Methode wurde etabliert für Dünndarmgewebe, welches einen erheblich dünneres Wandgewebe besitzt als Venenmaterial (Mertsching und Brenning, 2001 zum Patent

angemeldet). Doch auch eine Verlängerung der Inkubationszeiten von 20 Minuten auf 90 Minuten zeigte keinen Einfluss auf die Entfernung der venösen Zellen. Allerdings blieb die extrazelluläre Matrix während dieser Behandlung in einem sehr guten Zustand. Die Behandlung der Matrix mit Aqua dest. hingegen ließ die faserigen Strukturen stark aufquellen, bis keinerlei Quervernetzung mehr zu erkennen war. Verwendet wurde die Dezellularisierung mit Aqua dest. für bovine Venen (Ichikawa et al., 1994) und bovine Harnleiter (Clarke et al., 2001). Die nachfolgenden Methoden führten alle zu dem gewünschten Ziel der Azellularität. Ausgehend von der von Meezan und Mitarbeiter (1975) entwickelten Methode, um von verschiedenartigsten Geweben, wie z.B. bovinen Blutgefäßen und Nierentubuli aus Kaninchen die Basalmembran zu isolieren, wurde in der vorliegenden Arbeit diese Methode für die Dezellularisierung von klappentragenden Venensegmente bis auf die Zugabe von Natriumdesoxycholat reduziert. Dadurch konnte innerhalb von 90 Minuten eine Azellularität erreicht werden, wobei die Quervernetzung der ECM erhalten blieb. Die Zugabe von Natriumazid zeigte bei gleichen Inkubationszeiten keine Veränderung, und wurde auch aufgrund der hohen Toxizität dieser Substanz nicht weiter verwendet. Nach Auswahl der Dezellularisierungsmethode wurden weiterführende Untersuchungen anhand von molekularbiologischen Methoden durchgeführt, um über eine Aufreinigung von Gesamt-DNA zelluläre Komponenten nachzuweisen. Die photometrische Messung ergab einen Anteil von Gesamt-DNA in den dezellularisierten Proben im Verhältnis zu den nativen Kontrollen von ca. 30 %. Dieser relativ hohe Wert steht im Kontrast zu den Ergebnissen der Gelelektrophorese, die keine Bandenbildung bei den azellulären Proben zeigten. Diese Diskrepanz entstand dadurch, dass bei der photometrischen Messung Degradationsprodukte mitgemessen wurden. Für einen späteren präklinischen Einsatz ist es jedoch notwendig, einen weiterführenden Verdau mit DNasen und RNasen durchzuführen, um sicherzustellen, dass keine Nukleinsäuren tierischer Krankheitserreger wie DNA- oder RNA-Viren noch nach der Dezellularisierung in der Spendermatrix vorhanden sind (Martin et al., 2000). Eine zusätzliche histologische Untersuchung mit Hilfe der Elastika van Gieson-Färbung zeigte in den mit Natriumdesoxycholat dezellularisierten Proben ein gut erhaltenes Netz aus elastischen Fasern in der *Tunica media*. Dieses Fasernetz ist besonders wichtig für die vasomotorischen Eigenschaften der hergestellten Matrix (Edelman, 1999) und es liegen bisher keine Arbeiten vor, die eine Synthese von Elastin *in vitro* während der Rebesiedlungsphase dokumentieren. Die nach Dezellularisierung aufgebrauchten Zellkulturen zeigten eine Adhäsion der Endothelzellen, sowie eine Immigration interstitieller Zellen wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen. Dies belegt, dass das verwendete Azellularisierungs-Verfahren mit

---

Natriumdesoxycholat keine zelltoxischen Auswirkungen auf die neu aufgesiedelten Zellen hatte.

### **5.5. Kultur primärer Zellen**

Parallel zu der Matrixaufbereitung mussten zur Herstellung von bioartifiziellen Venenklappensegmenten autologe Zellen zum einen isoliert, und zum anderen in zweidimensionaler Kultur expandiert werden. Hierbei sollte jedoch die Expansionsphase so kurz wie möglich gehalten werden, da es zahlreiche Hinweise darauf gibt, dass Zellen in zweidimensionaler Kultur dedifferenzieren, was sich darin äußert, dass diese Zellen bestimmte Oberflächenmarker nicht mehr exprimieren (Bicknell, 1996 und Schnell, 2001). Endothelzellen (EC) wurden als Monokultur, die Fibroblasten (Fb) und glatte Muskelzellen (SMC) hingegen als Kokultur von Myofibroblasten (MFb) expandiert. Zum Zeitpunkt der Rebesiedlung waren nur ca. 42 % der Endothelzellen von Willebrand-Faktor (vWF)- positiv. Durch eine zusätzliche Färbung mit UEA I (*Ulex europaeus agglutinin* Typ I), einem weiteren EC-Marker, wurden hingegen alle Zellen positiv angefärbt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bereits ein großer Teil der EC im Hinblick auf die Expression von vW-Faktor dedifferenziert waren, bzw. diesen Faktor in einem so geringen Maß exprimierten, dass dieser immunhistologisch nicht mehr nachweisbar war. In der Kokultur der MFb konnte über eine spezifische Immunhistologie unter Verwendung des anti-Desmin Antikörpers der prozentuale Anteil der SMC mit 7 % bestimmt werden. Zum Ausschluss, dass es sich bei Desmin-negativen Zellen um EC handelte, wurde als Kontrolle auch an diesen eine immunhistologische Färbung mit vW-Faktor durchgeführt, die wie erwartet vollständig negativ war. Da in Blutgefäßen nur drei Zelltypen vorkommen (EC, Fb und SMC), kann aufgrund der vorliegenden immunhistologischen Daten davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Desmin-negativen Zellen um Fibroblasten handelt.

### **5.6. Rebesiedlung**

Für eine Rebesiedlung der dreidimensionalen klappentragenden Matrix war es zunächst notwendig, die Zellzahlen von EC und MFb in einer zweidimensionalen Rebesiedlung zu optimieren. Der Nachteil einer zu geringen Zelldichte ist, dass keine Zell-Zell-Kontakte aufgebaut werden können, was nach einiger Zeit ein Absterben der Zellen zur Folge hat. Umgekehrt führt eine stark erhöhte Zelldichte zu einer Adhärenz der Zellen untereinander, so dass keine Zell-Matrix-Kontakte aufgebaut werden können. Deshalb wurde in zweidimensionalen Besiedlungsexperimenten die optimale Zellzahl ermittelt und

anschließend auf die gesamte Fläche der Vene angepasst. Hierbei sollten sich die EC luminal absetzen, während die MFb als interstitielle Zellen in die Matrix immigrieren mussten. Um die Besiedlung mit beiden Zellpopulationen gleichzeitig beenden zu können, wurde mit der Besiedlung der EC eine Woche nach MFb Besiedlung begonnen. Für die Ausrichtung der aufgesiedelten Zellen im Gewebe waren nach jeder Besiedlung Perfusionen mit Kulturmedium notwendig, um einen sogenannten „shear stress“ zu erzeugen und um zu verhindern, dass die Kulturen dedifferenzieren (Cucina et al., 1995 und Rademacher et al., 2001). Der Einfluss von Flüssigkeitsströmungen zur Erzeugung des „shear stress“ auf das Verhalten von Endothelzellen wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht (Koslow et al., 1986 und Christensen et al., 1992). Ando und Mitarbeiter (1993) wiesen darauf hin, dass zahlreiche Funktionen der Endothelzellen durch den auf sie wirkenden „shear stress“ beeinflusst werden, wie z.B. die Formation des Zytoskeletts. Durch Mechanosensoren auf der Oberfläche der Endothelzellen werden zahlreiche Signalsysteme initiiert, die zu funktionellen Veränderungen der Zellen führen. Diese Sensoren sind jedoch noch weitgehend unbekannt (Ali und Schumacker, 2002).

### **5.7. Charakterisierung der rebesiedelten Segmente**

Die Kultur der Zellpopulationen im dreidimensionalen Bioreaktorsystem unter Perfusion beeinträchtigte weder das faserige Elastin- und Kollagen- Netzwerk, noch die ausgeprägte Quervernetzung dieser ECM- Bestandteile und die daraus resultierenden räumlichen Verhältnisse.

Nach Rebesiedlung konnten die luminal angesiedelten Zellen immunhistologisch als EC charakterisiert werden; im Gegensatz zu den EC-Zytopots exprimierte das konfluente Endothel vollständig von Willebrand-Faktor. Die im Bereich der Media und Adventitia eingewanderten Zellen exprimierten gefäßzellenspezifisches Vimentin und auch muskelzellspezifisches Desmin. Zudem war zu beobachten, dass die SMC sich zu einer Gefäßmuskelzellschicht in der Media parallel zur Strömungsrichtung ausrichteten, obwohl in den zweidimensionalen MFb-Zellkulturen nach Expansion nur in durchschnittlich 7 % der Zellen eine Desmin Expression immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte. Das diese Zellen sich überhaupt in der Media ansiedelten und geordnete Strukturen annahmen belegt, dass die Zellkulturbedingungen während der Rebesiedlungsphase sowie die Kollagenzusammensetzung der verwendeten azellulären Matrix den physiologischen Anforderungen der Zellen entsprachen. Interstitielle Zellen, die nicht Desmin-positiv waren,

wurden als Fibroblasten identifiziert. Sie waren vorwiegend in der *Tunica adventitia* zu finden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Rebesiedlung unter Perfusionsbedingungen von klappentragenden Venensegmenten etabliert und standardisiert werden, die zu einem histologisch intaktem Gewebe führte, welches sich kaum von nativem Gewebe unterschied. Die Herstellung von Venensegmenten *in vitro* - von der Isolation der Zellen mit paralleler Aufbereitung der klappentragenden Matrixstrukturen bis zum Abschluss der Rebesiedlung - konnte in einem Zeitrahmen von 6 Wochen durchgeführt werden. Dieser zeitliche Rahmen ist besonders für eine spätere präklinische Forschung an diesem Modell interessant, da aus einer Patientenbiopsie bereits nach 6 Wochen ein vollständiges Transplantat hergestellt werden kann.

### **5.8. Tiermodell**

Das in dieser Arbeit untersuchte Schaf- Modell bietet den Vorteil, das es sich beim Schaf um eine Tierart mit besonders ausgeprägten Venenklappen handelt. Außerdem entsprechen die ovinen Jugularvenen vom Durchmesser her denen der humanen Femoral- Vene im Bein (Pavcnik et al., 2002). Für weiterführende xenogene Arbeiten an diesem Modell könnte daher die ovine Jugularvene als Matrix für humane Zellen dienen, um so Klappentransplantate für Patienten mit chronisch venöser Insuffizienz (CVI) herzustellen. Weiterhin ist in zahlreichen Arbeitsgruppen, welche xenogene Herzklappentransplantationen im Schaf durchführen beschrieben, dass im wachsenden Schaf über kurze Zeiträume besonders gut Kalzifizierungsprozesse zu beobachten sind (Palma et al., 1991). Diese Beobachtungen beschrieben vor allem Gallo und Mitarbeiter (1986) mit porcinen und Hoffmann und Mitarbeiter mit bovinen Herzklappen (1992) bei der Implantation im Schaf. Anhand dieser Beobachtungen konnten auch in der vorliegenden Arbeit Aussagen über die Kalzifizierung der Venenklappentransplantate, besonders der azellulär implantierten, getroffen werden.

### **5.9. Autotransplantate**

Vor der *in vitro* Testung bioartifizieller klappentragende Venensegmente, wurden Autotransplantationen, also autologe Transplantationen der rechten Jugularvene auf die linke Halsseite des Schafes, durchgeführt. Mit diesem Versuch konnte belegt werden, dass die Operationstechnik keine Auswirkung auf die Entstehung von Thromben oder Neo-Intima-Bildung hatte. Auch im Bereich der Anastomosen (Nahtstellen) konnten keine thrombotischen Veränderungen beobachtet werden. Immunhistochemisch konnte eine konfluente

Endothelzellschicht sowie eine intakte Media mit glatten Muskelzellen nachgewiesen werden. Inflammatorische Reaktionen konnten ebenfalls über eine immunhistochemische Markierung von Leukozyten nicht im Gewebe beobachtet werden. Allerdings zeigten die Schnitte in allen drei Schichtungen der Venenwand (Intima, Media und Adventitia) eine Prokollagen I-Synthese. Dies deutet auf eine allgemeine Aktivierung der Zellen hin, Matrixkomponenten umzubauen, ausgelöst durch die Operationstechnik.

### 5.10. Azelluläre Explantate

Durch diese Implantationsreihe konnte eindeutig belegt werden, dass azelluläre Matrixstrukturen nach Implantation nicht zu funktionsfähigem Gewebe führen, da sie *in vivo* thrombosieren und kalzifizieren. Schon nach 1 Woche Implantation waren alle 4 Segmente über die gesamte luminalen Oberfläche thrombosiert, Segelstrukturen konnten nur noch in 2 Proben histologisch detektiert werden. Die thrombotischen Auflagerungen auf Wand und Segel stellten sich in der Elastika von Gieson-Färbung als gelbe Schicht dar. Nach 6 Wochen Implantation zeigten nur noch 2 von 6 Segmenten frisches Thrombusmaterial auf der Venenwand, wohingegen die anderen 4 Segmente eine Neo-Intima gebildet hatten, die aus kollagenem Material und zellulären Komponenten bestand. Diese Neo-Intima stellte sich in der Elastika von Gieson-Färbung rosa dar, ein Beleg dafür, dass es sich bei diesen neuen Strukturen um Kollagen handelte. In diesen Proben konnte zusätzlich beobachtet werden, dass sich zum Lumen hin die *in vivo* neugebildeten Strukturen gelblich anfärbten, was bedeutete, dass zunehmend mehr Plasmabestandteile in der Neo-Intima waren. In diesen „gelben“ Bereichen waren ebenfalls Zellen zu erkennen, diese besaßen jedoch keinen Zellkern, was ein deutlicher Hinweis darauf ist, dass es sich hierbei um Erythrozyten gehandelt haben muss. Dieser luminalen Thrombus mit kollagenen Strukturen zur ursprünglich implantierten Wand hingehend lässt vermuten, dass die Neo-Intima das Produkt eines ehemaligen Thrombus ist. Nach Entstehen eines frischen Thrombus wurde dieser von Gefäßzellen besiedelt und reorganisiert, d.h. diese Zellen haben Thrombusmaterial abgebaut und neues kollagenes Material synthetisiert. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Kollagen, elastische Fasern konnten nicht beobachtet werden.

Eine Rebesiedlung *in vivo* mit EC und Fb nach 1 und zusätzlich mit SMC nach 6 Wochen fand auch im Bereich der ursprünglich implantierten azellulären Matrix statt. Die eingewanderten SMC's waren jedoch nicht nur in der *Tunica media*, sondern auch in *Tunica adventitia* und in der Neo-Intima zu finden. In den genannten Schichten arrangierten sich die SMC's ungeordnet und nicht gewebetypspezifisch in der Matrix. Als luminaler

Gewebeabschluss war bei allen Segmenten eine konfluente Zellschicht zu finden. Denkbar ist, dass diese Zellen als Vorläuferzellen, zirkulierend im peripheren Blut in das Gewebe eingewandert sind und sich dort aufgrund der Zell-Matrix-Kontakte zu Gefäßzellen differenziert haben. Beschrieben ist dieses Verhalten in erster Linie von Endothelzellen, die sich als EPC's („endothelial precursor cells“) an azelluläre Strukturen anlagern, dort differenzieren und zu einem konfluenten Endothel führen (Huyn et al., 1999, Poole et al., 2001 und Nerem und Seliktar, 2001).

Das von Stock und Mitarbeitern (2001) diskutierte Konzept des „guided tissue regeneration“, welches beinhaltet, dass azelluläre Implantate *in vivo*, als nach Implantation, optimal rebesiedelt werden und zu funktionsfähigem Gewebe führen, trifft beim Tissue Engineering von klappentragenden Segmenten, wie es in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, nicht zu. Die vorliegenden Ergebnisse konnten zeigen, dass azellulär implantierte Venenklappen bereits nach kurzer Zeit insuffizient werden, kalzifizieren und inflammatorische Reaktionen in Form von Leukozytenimmigration zeigen. Außerdem kommt es in den azellulär implantierten Strukturen in kurzer Zeit zu thrombotischen Ablagerungen auf der Intima, die über Reorganisation zur Bildung einer Neo-Intima führen. Diese Neo-Intima kann schließlich zu einer Occlusion (Verschluss) des Gefäßes führen.

### **5.11. *In vitro* rebesiedelte Implantate**

Die durchgeführten Kurzzeitimplantationen von *in vitro* rebesiedelten Venenklappensegmenten belegen, dass diese zumindest für 1 Woche im Organismus ihre Funktion übernehmen können. Dies ergibt sich zum einen aus der rein makroskopischen Beurteilung der Klappensuffizienz bei Perfusion mit PBS nach Explantation, und zum anderen - bei Vergleich mit nativer Vene - aus der Ansicht der luminalen Oberfläche. Immunhistologische Ergebnisse konnten zeigen, dass die *in vitro* aufgebrauchten Zellen auch nach 1 Woche *in vivo* in unveränderter Quantität nachweisbar waren. Lediglich in kritischen Bereichen waren entstehende Thrombusformationen nachweisbar, wie zum Beispiel im Klappensinus und an den Segelkommissuren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das während der Rebesiedlungsphase an diesen Stellen aufgebrauchte Endothel nicht funktionsfähig war. Ein Grund hierfür könnte die Perfusion nach Sedimentation der Zellen sein. Während der Perfusionsphase werden die Segmente in den Bioreaktoren kontinuierlich mit Medium durchspült, das bedeutet für die Venenklappen, dass sie ständig geöffnet sind und die Segel an der Venenwand anliegen. Zellen, die sich im Sinus der Segel befinden, erfahren

nicht den benötigten „shear stress“ (s.o.) und werden auch nicht optimal mit Nährstoffen versorgt. Dies könnte in den Zellen zu Dedifferenzierungen führen.

Nach 6 Wochen Implantation zeigte sich, dass die Thrombusformationen, die nach 1 Woche in den Klappenbereichen beobachtet wurden, wie bei den azellulär implantierten Proben zu einer Reorganisation und damit zu einer Neo-Intima führten. In den Explantaten, in denen makroskopisch keine Segel mehr zu erkennen waren, zeigte sich in der histologischen Auswertung, dass die Segel vollkommen in *in vivo* neusynthetisiertem kollagenen Material eingebettet waren. Luminale Wandbereiche stellten sich hingegen nicht nur makroskopisch wie nativ dar, (immun)histologisch lag ein konfluenter Endothel-Monolayer vor und es konnten keine thrombotischen Auflagerungen oder Neo-Intima-Bildungen in diesen Bereichen beobachtet werden

Im Gegensatz zu den azellulär implantierten Strukturen kam es nicht zu Kalzifizierungen und immunologischen Reaktionen wie Leukozytenimmigration, was ein Hinweis darauf ist, das zumindest das Venenwandgewebe, welches keine thrombotischen Auflagerungen aufwies, eine längerfristige Funktion im Empfängerorganismus übernehmen könnte.

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Venenklappentransplantate zeigten nach Kurzeitimplantation Funktionsfähigkeit und in überwiegenden Bereichen physiologisch intakte Eigenschaften, wie die gewebetypische Verteilung der EC, SMC und Fb, sowie ein Fehlen von Thrombusformationen in den luminalen Wandbereichen. In kritischen Bereichen, wie Segelkommissuren und Klappensinus konnte zwar ein konfluentes Endothel nach der Rebesiedlungsphase nachgewiesen werden, aber die gewählten Kulturbedingungen reichten nicht aus, um die volle Funktionsfähigkeit des Endothels *in vivo* zu gewährleisten. Ausgehend von diesen Bereichen kommt es nach weiterer Zeit *in vivo* zur Bildung einer Neo-Intima, die weite Teile im Bereich der Segel und auch zum Teil der Wand überlagert. Doch auch in diesen Explantaten waren keinerlei Abstoßungsreaktionen oder Degenerierungen bedingt durch Kalzifizierungen nachweisbar. In weiteren Arbeiten soll die EC-Besiedlung in den kritischen Bereichen durch den Einsatz von intermittierenden Perfusionsbedingungen optimiert werden. Die pulsatile Perfusion soll ein regelmäßiges Öffnen und Schließen der Venenklappen im Bioreaktor gewährleisten, so dass auch Zellen im Klappensinus optimal mit CO<sub>2</sub>, Sauerstoff und Nährstoffen über das Medium versorgt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tissue Engineering von klappentragenden Venensegmenten auf Basis einer dezellularisierten biologischen Matrix möglich ist. Bisher gibt es für den kardiovaskulären Bereich noch kein bioartifizielles Implantat das klinisch bereits Anwendung findet, obwohl bereits seit Jahren

Besiedlungsexperimente mit z.B. Herzklappen auf biologischer Matrix durchgeführt werden (Stock et al., 2000 und Steinhoff et al., 2000). Dies ist begründet in der Tatsache, dass bestehende Probleme, wie z.B. optimale *in vitro*-Kulturbedingungen, Thrombusformation bedingt durch endotheliale Dysfunktion und Kalzifizierung noch weiterer grundlegender Untersuchungen bedürfen (Nerem und Seliktar, 2001). Im Bereich des Tissue Engineering von kleinlumigen Gefäßen mit Durchmessern bis zu 6 mm besteht das Problem der Thrombosierung, welche auf nicht konfluentes, oder nicht funktionelles Endothel zurückzuführen ist (Greenwald und Berry, 2000 und Hoerstrup et al., 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass azellulär implantierte Matrix und nicht funktionelles Endothel in kritischen Bereichen (Klappensegel) zur Entstehung von Thromben führt. Zur Behebung dieser Probleme müssen derzeit noch nicht hinreichend aufgeklärte zelluläre Mechanismen untersucht werden. Im nativen Zellverband regulieren diese Mechanismen Interaktionen der Zellen untereinander, ebenso wie die Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix. Erst ein zusammenhängendes Interagieren dieser Mechanismen bedingt die biologische Funktionalität der Zellen-, bzw. des Gewebeverbandes *in vivo*.

Ein generelles Prinzip zur Herstellung bioartifizieller Prothesen besteht in der Isolation primärer gewebetypspezifischer Zellen aus dem für sie essentiellen Zellverband. Danach werden diese Zellen vereinzelt und in einer unphysiologischen Umgebung vermehrt. Dies ist vor allem für Endothelzellen aus Blutgefäßen beschrieben (Lamszus et al., 1999 und Schnell et al., 2001). Während dieser *in vitro*-Expansionsphase werden die Zellen aus einer ruhenden in eine mitotische Phase versetzt. Diese häufige Teilung der Zellen, die für die Expansionsphase *in vitro* notwendig ist, entspricht nicht dem nativen Status primärer vaskulärer Endothelzellen, die sich im adulten Organismus durchschnittlich zweimal in ihrer gesamten Lebenszeit teilen (Bicknell, 1996). Viele Arbeitsgruppen beobachten veränderte Proteinexpressionen an den zellulären Oberflächen (Dedifferenzierungen) während der zweidimensionalen Zellkultur, daher werden Endothelzellen auch nur bis zu der 4. Passage vermehrt (Bicknell, 1996 und Schnell et al., 2001) wenn sie im Bereich des Tissue Engineering eingesetzt werden sollen. Ein weiteres Dedifferenzierungsbeispiel liefern adulte Chondrozyten, die nicht in zweidimensionaler Kultur zu vermehren sind, da diese ihre Vitalität und Funktionalität nur in dreidimensionalen Kulturbedingungen erhalten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der Endothelzellmarker von Willebrand-Faktor, nach der Expansion nur noch bei ca. 40% der Endothelzellen nachweisbar war, wohingegen ein zweiter Marker *Ulex europaeus Agglutinin* Typ 1 (UEA I)

während der gesamten Zeit stabil exprimiert wurde. Nach Rebesiedlung auf einer dreidimensionalen Matrixstruktur werden Zell-Matrix-Kontakte wieder hergestellt, das bedeutet, dass die Zellen wiederum ihren gesamten Stoffwechsel aus dem mitotischen Zyklus in den ruhenden, aber biologisch funktionellen Status umstellen müssen. Bei diesem Prozess spielt die optimale Versorgung mit Nährstoffen, CO<sub>2</sub> und Sauerstoff und die richtigen biologischen Reize („shear stress“, mechanische Stimuli) eine wichtige Rolle. Bei den in der vorliegenden Arbeit gewählten Bedingungen gelingt dieses Konzept in weiten Bereichen (luminaler Wandbereich). Hier wurden die natürlichen Zellfunktionen wiederhergestellt, während in kritischen Bereichen (Segel) dieses Ziel nicht erreicht wurde. Weiterführende Arbeiten sollten so ausgerichtet sein, dass Kontrollen etabliert werden können, die eine Dedifferenzierungen frühzeitig anzeigen. Zum Beispiel könnte die Expression von Integrinen und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, wie z.B. der Rezeptor FLK 1 für den Wachstumsfaktor VEGF, immunhistochemisch und molekularbiologisch beobachtet werden. Danach können die Zellkulturbedingungen während der *in vitro*-Phase soweit adaptiert werden, dass eine Dedifferenzierung vermieden wird. Ein alternativer Lösungsweg wäre der Einsatz von endothelialen Vorläuferzellen (EPC's), die im peripheren Blut zirkulieren (Poole et al., 2001 und Sata et al., 2002), anstatt der Verwendung primärer Endothelzellen. Diese Zellen übernehmen auch im adulten Organismus Reparaturfunktionen beschädigter Blutgefäße oder beteiligen sich bei der Bildung neuer Gefäße (Angiogenese; Hanahan, 1997 und Walgenbach et al., 2001). Aus diesem Grund verfügen diese Zellen noch über ein hohes Teilungs- und Differenzierungspotential ausgelöst durch Zell-Matrixkontakt (Bicknell, 1996). Die Herstellung der Kompatibilität zwischen Endothel und Blut ist ein wichtiger Meilenstein, um funktionelle bioartifizielle Blutgefäße *in vitro* herzustellen. Zellen, die keinen unmittelbaren Blutkontakt haben, aber der Stabilität und Integrität des Implantates dienen, haben langfristige Auswirkungen auf die Funktionalität des Implantates. Häufig kommt es durch unphysiologische Hyperproliferation von glatten Muskelzellen, ausgelöst durch mechanische Reize wie z.B. dem Einsatz einer Gefäßstütze (Stent), zu einer Verengung bis hin zum Verschluss des Gefäßes (Sick et al., 2002). Xiang und Mitarbeiter (2000) machen für diese Verengung Kollagen III verantwortlich, welches von den glatten Muskelzellen in unphysiologischer Menge synthetisiert wird (s. Tab 1 in Kap. 1). In der vorliegenden Arbeit konnten derartige Probleme in den *in vitro* rebesiedelten Implantaten nicht beobachtet werden. Die SMC in den rebesiedelten Segmenten richteten sich entsprechen der Flussrichtung aus. Auch nach einer Implantationszeit von 6 Wochen konnte keine Hyperproliferation interstitieller Zellen in den bioartifiziellen Venenklappensegmenten

beobachtet werden. Dieses Ergebnis wird dahingehend interpretiert, dass die gewählten Kultur- und Rebesiedlungsbedingungen optimal gewählt wurden. Unterstützt wird dieser morphologische Befund durch den Sachverhalt, dass die kollagenen Strukturen der extrazellulären Matrix umgebaut werden. Dieser Abbau und die Neusynthese von Kollagen 1 ist ein wichtiger Prozess während natürlicher Reparaturprozesse im adulten Organismus. Wären die interstitiellen Zellen nicht in der Lage diesen Prozess durchzuführen, würden einseitige Abbauprozesse dazu führen, dass bioartifizielle Venenklappen während des gewählten Implantationszeitraumes an Stabilität verlieren würden. Der Gefäßdurchmesser würde bedingt durch Dilatation zunehmen und die angestrebte Klappenfunktion könnte nicht suffizient ausgeübt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Schaf als Tiermodell gewählt, weil hier Kalzifizierungsprozesse sehr frühzeitig und massiv entstehen. In den azellulär implantierten Segmenten der vorliegenden Arbeit konnten in den 1-Wochen implantierten erste Kalzifizierungserscheinungen nachgewiesen werden. Demgegenüber waren in den Explantaten *in vitro* rebesiedelter Venenklappen auch 6 Wochen nach Implantation keine Kalkablagerungen nachzuweisen. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu Arbeitsgruppen, die positive Erfolge mit azellulär implantierten Geweben beschrieben. Ein Beispiel hierfür ist die Arbeitsgruppe von Kim und Mitarbeiter (2001), die azelluläre und *in vitro* rebesiedelte Herzklappen in Schafe implantierten, ohne nach Explantation Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen festzustellen. Auch Elkins und Mitarbeiter (2001) implantierten sowohl allogene als auch xenogene Herzklappen in Schafe ohne negative Ergebnisse. Die vorliegende Arbeit konnte jedoch zeigen, dass für das Tissue Engineering von funktionellen Venenklappen eine Rebesiedlung *in vitro* zwingend notwendig ist.

Im Gegensatz zu der eingeschränkten Funktionalität der Endothelzellen in kritischen Bereichen der bioartifiziellen Venenklappen kann aufgrund der beschriebenen Kompatibilität interstitieller Zellen wie glatte Muskelzellen davon ausgegangen werden, dass die *in vitro* begonnenen physiologischen Umbauprozesse der ECM nach Implantation in den Empfänger weiter fortgesetzt werden, bis schließlich alle „fremden“ (allogenen) Matrixstrukturen durch körpereigene neusynthetisierte Matrixproteine ersetzt werden. In den in dieser Arbeit hergestellten Venenklappensegmenten wurden nach Implantation eine Revaskularisierung festgestellt, die einen weiteren Hinweis dafür bietet, dass das Gewebe in den Organismus einbezogen und nicht als fremd erkannt wird. Die Zellen ordneten sich in die für sie spezifischen Schichtungen der ECM der Vene an. Die ECM unterliegt physiologischen

Umbauprozessen, die anhand der Prokollagen I- Synthese belegt werden konnte. Weiterhin konnten weder Instabilitäten (Dilatationen), noch Kalzifizierungen nachgewiesen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* Venenklappensegmente durch Methoden des Tissue Engineering hergestellt und auf ihre *in vivo* Kompatibilität getestet. Dabei zeigte sich, dass durch die gewählten Versuchsbedingungen im Zeitrahmen von 6 Wochen *in vitro* Venenklappen hergestellt werden können, deren morphologische und histologische Charakteristika einer nativen Venenklappe entsprechen. Ein allogenes Modell zur bioartifiziellen Herstellung von Venenklappen wurde realisiert. Das in dieser Arbeit etablierte Tiermodell eignet sich zur Überprüfung der Lang- und Kurzzeit- Funktionalität *in vivo*. Weiterhin konnte belegt werden, dass azellulär implantierte Venenklappensegmente nicht zu funktionellen Gefäßen führen. *In vitro* rebesiedelte Segmente blieben nach 1 Woche Implantation suffizient; jedoch führten thrombotische Auflagerungen im Klappensinus und an den Segelkommissuren nach 6 Wochen zur Bildung einer Neo-Intima, die eine weitere Funktion der Klappensegel verhinderte.

Kann in weiterführenden Experimenten die Thrombosierung an den kritischen Bereichen der Venenklappe verhindert werden, bietet dieses Modell eine Basis für den xenogenen Einsatz von *in vitro* hergestellten Venenklappen zur Therapie von Patienten mit chronischer venöser Insuffizienz.

---

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberti, S. (1585).** De valvulis membraneis quorundam vasorum, etc. In: Tres orationes. Nürnberg: In officina typographica Catharinae Gerlachiae
- Ali, M.H. und Schumacker, P.T. (2002).** Endothelial response to mechanical stress: where is the mechanosensor?  
Critical Care Medicine. 30 (5 Suppl): 198-206
- Ando, J. und Kamiya, A. (1993).** Blood flow and vascular endothelial cell function.  
Frontiers in Medical and Biological Engineering. 5 (4): 245-264
- Augustin, M., Zschocke, I., Vanscheidt, W. und Schöpf, E. (1999).** Lebensqualität bei chronischer Veneninsuffizienz - Der Freiburger Fragebogen zur Erfassung der Lebensqualität bei Venenerkrankungen.  
Deutsches Ärzteblatt; 96(30):B1588-B1590.
- Bader, A., Knop E., Böker, K.H.W., Come, O., Frühauf, N., Gonschior, A.K., Christians, U., Esselmann, H., Pichlmayer, R. und Sewing, K.-F. (1996).** Tacrolimus (FK 506) biotransformation in primary rat hepatocytes depends on extracellular matrix geometry.  
Naunyn-Schmiedberg's Archive of Pharmacology. 353, 461-473, Springer Verlag, Heidelberg.
- Belcaro, G., Nicolaidis, A. N., Lennox, A., Agus, G., Geroulakos, G., Sabetai, M. und Artese, L. (2000).** Tissue response to an expanded polytetrafluoroethylene external valve support device: a histologic study in dogs.  
Angiology. 51 (8): S33-S38
- Bergemann, R., Lauterbach, K.W., Vanscheidt, W., Neander, K.D. und Engst, R. (1999).** Economic evaluation of the treatment of chronic wounds: hydroactive wound dressings in combination with enzymatic ointment versus gauze dressings in patients with pressure ulcer and venous leg ulcer in Germany. Pharmacoeconomics;16 (4): 367-377.
- Bicknell, R. (1996).** Endothelial cell culture.  
Handbook in practical animal cell biology; Cambridge University press
- Bosanquet, N. und Franks, P. (1996).** Venous diseases: the new international challenge.  
Phlebology. 11 (1): 6-9
- Brown, W.M., Jay, J.L. und Gott, J.P. (1991).** Placement of aortic valve bioprostheses in sheep via a left thoracotomy. Implantation of stentless porcine heterografts.  
ASAIO Journal. 37: M445-M446
- Burkhart, H. M., Fath, S. W., Dalsing, M. C., Sawchuk, A. P., Cikrit, D. F. und Lalka, S. G. (1997).** Experimental repair of venous valvular insufficiency using a cryopreserved venous valve allograft aided by a distal arteriovenous fistula.  
Journal of Vascular Surgery. 26 (5): 817 - 822
- Burmester, G.-R. und Pezzutto, A. (1998).** Taschenatlas der Immunologie.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Cheresh, D.A., Berliner, S.A., Vicente, V. und Ruggeri, Z.M. (1989).** Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen ba related integrins on platelets and endothelial cells.  
Cell. 58 (5): 945-95
- Christensen, C.W., Samet, M.M., Chick, D.M. und Lelkes, P.I. (1992).** Experimental studies of pulsatile flow and endothelial cell adaption in ventricle shaped cell culture chambers  
ASAIO Journal. 38 (3): M501-M506

- Clarke, D. R., Lust, R. M., Sun, Y. S., Black, K. S. und Ollerenshaw, J. D. (2001).** Transformation of nonvascular acellular tissue matrices into durable vascular conduits. *Annales of Thoracic Surgery*. 71: S433 – S436
- Conte, M.S. (1998).** The ideal small arterial substitute : a search for the Holy Grail ?  
*The FASEB Journal*. 12: 43-45
- Cucina, A., Sterpetti, A. V., Pupelis, G., Fragale, A., Lepidi, S., Cavallaro, A., Giustiniani, Q. und Santoro D'Angelo, L. (1995).** Shear stress induces changes in the morphology and cytoskeleton organisation of arterial endothelial cells.  
*European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 9 (1): 86-92
- Dalsing, M. C., Raju, S., Wakefield, T. W. und Taheri, S. (1999).** A multicenter, phase I evaluation of cryopreserved venous valve allografts for the treatment of chronic deep venous insufficiency.  
*Journal of Vascular Surgery*. 30 (5): 854 – 866
- Dalsing, M., Ricotta, J.J., Wakefield, T., Lynch, T.G. und Ouriel, K. (1998).** Animal models for the study of lower extremity chronic venous disease: lessons learned and future needs.  
*Annals of Vascular Surgery*; 12(5):487-494
- Dohmen, P. M., Ozaki, S., Yperman, J., Flameng, W. und Konertz, W. (2001).** Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep.  
*Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 13 (4 Suppl): 93-98
- Edelman, E. R. (1999).** Vascular tissue engineering.  
*Circulation Research*. 85: 1115-1117
- Elkins, R. C., Goldstein, S., Hewitt, C. W., Walsh, S. P., Dawson, P. E., Ollerenshaw, J. D., Black, K. S., Clarke, D. R. und O'Brien, M. F. (2001).** Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling.  
*Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 13 (4, Suppl. 1): 87-92
- Estienne, C. (1545).** De dissectione partium corporis humani libri tres.  
Paris : apud Simonem Colineum. 182-186, 356-357
- Fabricius ab Aquapendente, H. (1981).** Le de Venarum Ostiolis de Jrome Fabrice d' Aquapendente.  
Paris : L. Pariente
- Franklin, K.J. (1927).** Valves in the veins- an historical survey.  
*Proc R Soc Med*. 21: 1-34
- Fuchs, J. R., Nasser, B. A. und Vacanti, J. P. (2001).** Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction.  
*Annals of Thoracic Surgery*. 72: 577 – 591
- Gallo, I., Nistal, F., Fernadnez, D., Factor, S.M. und Frater, R.W. (1986).** Comparative study of calcification in the T6- treated and standard Hancock-I porcine xenografts: experimental study in weanling sheep.  
*Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 34 (5):310-315
- Gomez-Jorge, J., Venbrux, A. C. und Magee, C. (2000).** Percutaneous deployment of a valved bovine jugular vein in the swine venous system: a potential treatment for venous insufficiency.  
*Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 11: 931 – 936
- Greenwald, S.E. und Berry, C.L. (2000).** Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties.  
*Journal of Pathology*. 190 (3): 292-299
- Gruss, J.D. (2001).** Rekonstruktive Venenklappenchirurgie [Reconstructive venous valve surgery].  
*Zentralblatt der Chirurgie*;126 (6): 461-5.

**Guide for the care and use of laboratory animals.**

- [www.nap.edu/catalog/5140.html](http://www.nap.edu/catalog/5140.html) ed. Washington DC: National Academy Press, 1996
- Hanahan, D. (1997).** Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. 277: 48-50
- Harvey, W. (1628).** Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguini in animalibus. *Sumptibus Guiliemi Fitzeri*. 54-64
- Hoerstrup, S.P., Zund, G., Sodian, R., Schnell, A.M., Grunenfelder, J. und Turina, M.L. (2001).** Tissue Engineering of small caliber vascular grafts. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*. 20 (1): 164-169
- Hoffmann, D., Gong, G., Liao, K., Macaluso, F., Nikolic, S.D. und Frater, R.W. (1992).** Spontaneous host endothelial growth on bioprosthesis. Influence of fixation. *Circulation*. 86 (5 Suppl): II75-II79
- Hubbell, J.A. (1999).** Bioactive Biomaterials. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 123-129
- Huynh, T., Abraham, G., Murray, J., Brockbank, K., Hagen, P.-O. und Sullivan, S. (1999).** Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. *Nature Biotechnology*. 17:1083-1086
- Ichikawa, Y., Noishiki, Y., Soma, T., Ishii, M., Yamamoto, K., Takahashi, K., Mo, M., Kosuge, T., Kondo, J. und Matsumoto, A. (1994).** A new antithrombogenic RV-PA valved conduit. *ASAIO Journal*. 40: M714 – M718
- Iruela-Arispe, M. L., Rodriguez-Manzanque, J. C. und Abu-Jawdeh, G. (1999).** Endometrial endothelial cells express estrogen and progesterone receptors and exhibit a tissue specific response to angiogenic growth factors. *Microcirculation*. 6 (2): 127-140
- Iyengar, A.K.S., Sugimoto, H., Smith, D.B. und Sacks, M.S. (2001).** Dynamic in vitro quantification of bioprosthetic heart valve leaflet motion using structured light projection. *Annals of Biomedical Engineering*. 29 (11): 963-973
- Joshi, P., Chung, C.Y., Aukhil, I. und Erickson, H.P. (1993).** Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin. *Journal of Cell Science*. 106 (Pt 1): 389-400
- Kim, W. G., Cho, S. K., Kang, M.-C., Lee, T.-Y. und Park, J. K. (2001).** Tissue-engineered heart valve leaflets: An animal study. *The International Journal of Artificial Organs*. 24 (9): 642-648
- Kim, W. G., Park, J. K., Park, Y. N., Hwang, C. M., Jo, Y. H., Min, B. G., Yoon, C. J. und Lee, T.-Y. (2000).** Tissue-engineered heart valve leaflets: an effective method for seeding autologous cells on scaffolds. *The International Journal of Artificial Organs*. 23 (9): 624 – 628
- Kistner, R.L. (1968).** Surgical repair of a venous valve. *Straub Clinical Procedures*. 34: 41-43
- Kistner, R.L. (1990).** Surgical technique of external venous valve repair. *The Straub Foundation Proceedings*. 55: 15-16
- Koslow, A.R., Stromberg, R.R., Friedman, L.I., Lutz, R.J., Hilbert, S.L. und Schuster, P. (1986).** A flow system for the study of shear forces upon cultured endothelial cells. *Journal of Biomedical Engineering*. 108: 338–341
- Kurz, X., Kahn, S. R., Abenhaim, L., Clement, D., Norgren, L. und Baccaglioni, U. (1999).** Chronic venous disorders of the leg: epidemiology, outcomes, diagnosis and management. Summary of an evidence-based report of the VEINES task force.

- Venous Insufficiency Epidemiologic and Economic Studies  
International Angiology; 18 (2): 83-102
- Lamszus, K., Schmidt, N. O., Ergun, S. und Westphal, M. (1999).** Isolation and culture of human neuromicrovascular endothelial cells for the study of angiogenesis in vitro.  
Journal of Neuroscience Research. 55 (3): 370-381
- Langer, R. und Vacanti, J.P. (1993).** Tissue engineering.  
Science; 260: 920-926
- Laube, H. R. und Matthäus, M. (2001).** A new semi-automatic endothelial cell seeding technique for biological prosthetic heart valves.  
The International Journal of Artificial Organs. 24 (4): 243 – 246
- Leibowitz, J.O. (1957).** Early accounts of the valves of the veins.  
Journal of the History of Medicine. 80: 189-196
- Liu, S. Q. (1998).** Prevention of intimal hyperplasia in rat vein grafts by using a tissue engineered approach.  
Atherosclerosis. 140 (2): 365-377
- Liu, S.Q., Moore, M.M. und Yap, C. (2000).** Prevention of mechanical stretch- induced endothelial and smooth muscle cell injury in experimental vein grafts.  
Journal of Biomech Eng. 122 (1): 31-38
- Ludbrook, J. (1963).** Valvular defect in primary varicose veins, cause or effect?  
Lancet. 2: 1289-1290
- Lyons, A.S. und Petrucelli II. R.J. (1978).** Medicine- an illustrated history.  
Herausgeber: Harry N. Abrams. 416-418, 432-437
- MacKenna, D., Summerour, S. R. und Villareal, F. J. (2000).** Role of mechanical efactors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis.  
Cardiovascular Research. 46: 257 – 263
- Madar, G., Widmer, L.K., Zemp, E. und Maggs, M. (1986).** Varicose veins and chronic venous insufficiency - a disorder or disease? A critical epidemiological review.  
VASA 1986;15:126.
- Makarova, N. P., Lurie, F. und Hmelniker S. M. (2001).** Does surgical correction of the superficial femoral vein valve change the course of varicose disease?  
Journal of Vascular Surgery. 33 (2): 361-368
- Mann, B. K. und West, J. L. (2001).** Tissue engineering in the cardiovascular system: progress toward a tissue engineered heart.  
The Anatomical Record. 263: 367-371
- Markel, A., Manzo, R.A., Bergelin, R.O. und Strandness, D.E.Jr. (1992).** Valvular reflux following deep vein thrombosis: incidence and time of occurrence.  
Journal of Vascular Surgery. 15: 377-382
- Martin, U., Winkler, M.E., Id, M., Radeke, H., Arseniev, L., Takeuchi, Y., Simon, A.R., Patience, C., Haverich, A. und Steinhoff, G. (2000).** Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV).  
Xenotransplantation. 7 (2): 138-142
- Maxwell, L., Gavin, J. B. und Barratt – Boyes, B. G. (1989).** Differences between heart valve allografts and xenografts in the incidence and initiation of dystrophic calcification.  
Pathology. 22: 5 – 10
- Meezan, E., Hjelle, J. T., Brendel, K. (1975).** A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues.  
Life Sciences. 17: 1721
- Mertsching, H. und Brenning, O. (2001).** Patentanmeldung zur Azellularisierung von porciner SIS.

- Meuris, B., Ozaki, S., Herijgers, P., Verbeken, E. und Flamong, W. (2001).** Influence of species, environmental factors, and tissue cellularity on calcification of porcine aortic wall tissue.  
Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery. 13 (4 Suppl 1): 99-105
- Moiseeva, E.P. (2001).** Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions.  
Cardiovascular Research. 52(3):372-86
- Moneta, G.L., Nehler, M.R. und Porter, J.M. (2000).** Pathophysiology of chronic venous insufficiency.  
Vascular Surgery. 5. Edition: 1982-1990
- Nakagawa, Y., Moldeus, P. und Moore, G.A. (1996).** Relationship between mitochondrial dysfunction and toxicity of propyl gallate in isolated rat hepatocytes.  
Toxicology. 114 (2): 135-145
- Nerem, R. M. und Seliktar, D. (2001).** Vascular tissue engineering.  
Annual Review of Biomedical Engineering. 3: 225-243
- Niklason, L. E., Gao, J., Abbott, W. M., Hirschi, K. K., Houser, S., Marini, R. und Langer, R. (1999).** Functional arteries grown in vitro.  
Science. 284: 46-51
- O'Brien, M. F., Goldstein, S., Walsh, S., Black, K. S., Elkins, R. und Clarke, D. (1999).** The SynerGraft: a new acellular (nonglutardehyd-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation.  
Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery. 11 (4) Suppl I: 194 – 200
- Palma, A., Hoffmann, D.M., Nanna, M., Fernandes, S. und Sisto, D.A. (1991).** Transoesophageal echocardiography for the evaluation of mitral valve prostheses in the weanling sheep.  
ASAIO Transplantation. 37 (3): M169-M170
- Parnigotto, P. P., Gamba, P. G., Conconi, M. T. und Midrio, P. (2000).** Experimental defect in rabbit urethra repaired with acellular aortic matrix.  
Urological Research. 28: 46 – 51
- Pavcnik, D., Uchida, B. T., Timmermans, H. A., Corless, C. L., O'Hara, M., Toyota, N., Moneta, G. L., Keller, F. S. und Rösch, J. (2002).** Percutaneous bioprosthetic venous valve: A long term study in sheep.  
Journal of Vascular Surgery. 35: 598-602
- Poole, T. J., Finkelstein, E. B. und Cox, C. M. (2001).** The role of VEGF in angioblast induction and migration during vascular development.  
Developmental Dynamics. 220: 1 – 17
- Qui, Y., Quijano, R. C., Wang, S. K. und Hwang, H. C. (1995).** Fluid dynamics of venous valve closure.  
Annals of Biomedical Engineering. 23: 750-759
- Rademacher, A., Paulitschke, M., Meyer, R. und Hetzer, R. (2001).** Endothelialization of PTFE vascular grafts under flow induces significant cell changes.  
The International Journal of Artificial Organs. 24 (4): 235 – 24
- Reissig, D. und Schmidt, Ch. (1998).** Enhanced expression of integrin receptors during proliferation of activated keratinoblasts prepared for transplantation as cell suspension in fibrinous matrix.  
In: Biological Matrices and Tissue Reconstruction; Herausgeber: Stark, G. B., Horch, R. und Tanczos; E.; Kap. 10: 97-103
- Romanos, G.E., Hotz, S.T.K., Beyer, F. und Strub, J.R. (1998).** Influence of collagen membranes and collagenous sponge material in the connective tissue matrix during wound healing: an immunohistochemical study.

- In: Biological Matrices and Tissue Reconstruction; Herausgeber: Stark, G. B., Horch, R. und Tanczos, E.; Kap. 2: 13-19
- Sally, J.N., Boenisch, T., Farmilo, A.J., Stead, R.H. (1989).** Handbuch II immunchemischer Färbemethoden – Dako Corporation : 25
- Sanchez-Hanke, M., Püschel, K. und Leuwer, R. (2000).** Zur Anatomie der Venenklappen der V. jugularis interna.  
Laryngorhinootology. 79: 332-336
- Sanyal, A. J. und Mirshahi, F. (1999).** Endothelial cells lining transjugular intrahepatic portasystemic shunts originate in hepatic sinusoids: implications for pseudointial hyperplasia.  
Hepatology. 29 (3): 710-718
- Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y. und Nagai, R. (2002).** Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis.  
Nature Medicine. 8 (4): 403-409.
- Schiebler, T.H., Schmidt, W. und Zilles, K. (1995).** Allgemeine Anatomie des Blutkreislaufs, Blut und Blutbildung.  
In: Anatomie; Thieme Verlag; Kap. 6: 159
- Schmidt, C.E. und Baier, J.M. (2000).** Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering.  
Biomaterials. 21: 2215-2231
- Schnell, A. M., Hoerstrup, S. P., Zund, G., Kolb, S., Sodian, R., Visjager, J. F., Grunenfelder, J., Suter, A. und Turina, M. (2001).** Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts.  
The Thoracic and Cardiovascular Surgeon. 49 (4): 221-225
- Scultetus, A. H., Villavicencio, J. L. und Rich, N. M. (2001).** Facts and fiction surrounding the discovery of the venous valves.  
Journal of Vascular Surgery. 33: 435-441
- Shinoka, T., Breuer, C.K., Tanel, R.E., Zund, G., Miura, T., Ma, P.X., Langer, R., Vacanti, J.P. und Mayer, J.E. (1995).** Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model.  
Ann. Thorac. Surg. 60: 513–516.
- Shinoka, T., Shum-Tim, D., Ma, P.X., Tanel, R.E., Langer, R., Vacanti, J.P. und Mayer, J.E. (1997).** Tissue-Engineered heart valve leaflets – Does cell origin affect outcome?  
Circulation. 98 (Supplement II) : 102–107.
- Sick, P.B., Brosteanu, O., Niebauer, J., Hehrlein, C. und Schuler, G. (2002).** Neointima formation after stent implantation in an experimental model of restenosis: polytetrafluoroethylene-covered versus uncovered stainless steel stents.  
Heart Diseases. 4 (1): 18-25
- Sievert, K.-D. und Tanagho, E. A. (2000).** Organ specific acellular matrix for reconstruction of the urinary tract.  
World Journal of Urology. 18: 19 – 25
- Silbernagl, S. und Despopoulos, A. (1991).** Taschenatlas der Physiologie.  
4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Skalak, R. und Fox, C. (1988).** Preface.  
In: Tissue engineering, New York: AR Liss.
- Skalak, R. und Fox, C.F. (1991).** Tissue Engineering.  
Annual Review of Biomedical Engineering. 19: 529-533
- Sodian, R., Hoerstrup, S.P., Sperling, J.S., Martin, D.P., Daebritz, S., Mayer, J.E. Jr. und Vacanti, J.P. (2000).** Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices

- for tissue engineering of heart valves.  
ASAIO Journal. 46: 107-110
- Steinhoff, G., Stock, U., Karim, N., Mertsching, H., Timke, A., Meliss, R. R., Pethig, K., Haverich, A. und Bader, A. (2000).** Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits.  
Circulation. 102 [suppl III]: III – 50 – III – 55
- Stock, U. und Vacanti, J.P. (2001).** Tissue Engineering: Current state and prospects.  
Annual Review of medicine. 52: 443-451
- Stock, U., Nagashima, M., Khalil, P. N., Nollert, G. D., Herden, T., Sperling, J. S., Moran, A., Lien, J., Martin, D. P., Schoen, F. J., Vacanti, J. P., Mayer, J. E. (2000).** Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation.  
The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 119: 732 – 740
- Storch, V. und Welsch, U. (1994).** Kurzes Lehrbuch der Zoologie.  
Gustav Fischer Verlag. 7. Auflage Kap. 8: Blutgefäß und lymphatische Systeme
- Strupp, W., Weidinger, G., Scheller, C., Ehret, R., Ohnimus, H., Girschick, H., Tas, P., Flory, E., Heinkelein, M. und Jassoy, C. (2000).** Treatment of cells with detergent activates caspase and induces apoptotic cell death.  
Journal of Membrane Biology. 175 (3): 181-189
- Sun, Y. und Weber, K. T. (2000).** Infarct scar: a dynamic tissue.  
Cardiovascular Research. 46: 250 – 256
- Sun, Y., Zhang, J. Q. und Lamparter, S. (2000).** Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats.  
Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 135 (4): 316 – 323
- Thum, T., Haverich, A. und Borlak, J. (2000).** Cellular dedifferentiation of endothelium is linked to activation and silencing of certain nuclear transcription factors: implications for endothelial dysfunction and vascular biology.  
FASEB Journal. 14: 740 – 751
- United Network Of Organ Sharing (UNOS, 2002).**  
URL: [http://www.unos.org/frame\\_Default.asp?Category=Newsdata](http://www.unos.org/frame_Default.asp?Category=Newsdata)
- Vacanti, J.P. (1988).** Beyond transplantation.  
Third Annual Samuel Jason Mixter Lecure.  
Archives of Surgery. 123: 545-549
- Vacanti, J.P. und Langer R. (1999).** Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation.  
Lancet. 354 (Suppl. 1): SI32-34
- Vacanti, J.P., Morse, M.A. und Saltzman, W.M. (1988).** Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices.  
Journal of Pediatric Surgery. 23:3-9
- Vesely, I. (2001).** The influence of design on bioprosthetic valve durability.  
Journal of Long Term Effects on Medical Implants. 11 (3-4): 137-149
- Walgenbach, K. J., Voigt, M., Riabikhin, A. W., Andree, C., Schaefer, D. J., Galla, T. J. und Stark, G. B. (2001).** Tissue engineering in plastic reconstructive surgery.  
The Anatomical Record. 263: 372-378
- Wang, J.-S., Shum-Tim, D., Galipeau, J., Chedrawy, E., Elipopoulos, N. und Chiu, R. C.-J. (2000).** Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: Feasibility and potential clinical advantages.  
The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 125 (5): 999 – 1006
- Watanabe, M., Shin'oka, T., Tohyama, S., Hibino, N., Konuma, T., Matsumura, G., Kosaka, Y., Ishida, T., Imai, Y., Yamakawa, M., Ikada, Y. und Morita, S. (2001).** Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model.  
Tissue Engineering. 7 (4): 429-439

- Widmer, L.K., Stähelin, H.B., Nissen, C. und da Silva, A. (1982).** Venen-, Arterienkrankheiten. Koronare Herzkrankheit bei Berufstätigen. Prospektiv-epidemiologische Untersuchung. Basler Studie I-III (1959-1978). Bern, Stuttgart, Wien: Huber; 1982
- Xiang, D., Huang, D., Gai, L. und Liu, H. (2000).** Relationship between expression of type III collagen and phenotype of vascular smooth muscle cells in neointimal of stented coronax artery. Chin. Medical Journal. 113 (4): 324-327

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung</b>	<b>Seite</b>
1 Die erste Zeichnung einer Venenklappe (Alberti, 1585)	2
2 Schema eines Venenklappensegels	3
3 Schematische Darstellung der Venenklappenfunktion durch Einsatz der Muskelpumpe.	6
4 Schema zum Tissue Engineering von klappentragenden Venensegmenten im allogenen Schafmodell.	17
5 Schema der Venenklappenphysiologie (Jugularvene).	26
6 Venenklappensegmente im Bioreaktor	39
7 Schematisches Modell der immunhistochemischen Färbung	42
8 Native ovine Vene. H&E- Färbung, 200x Vergrößerung	52
9 H&E- Färbung einer Venenwand nach Behandlung mit Trypsin/ EDTA. 100x Vergrößerung	53
10 Venensegmente nach Behandlung mit zwei verschiedenen Salzlösungen. H&E- Färbungen, 100x Vergrößerung	54
11 Dezellularisierung mit Aqua dest. H&E- Färbung, 100x Vergrößerung	55
12 Dezellularisierung eines Venensegmentes nach Meezan. H&E- Färbung, 100x Vergrößerung	55
13 Dezellularisierung mit Natriumdesoxycholat nach 90 Minuten Inkubation; H&E Färbung, 100x Vergrößerung	56
14 Vergleich des Gehaltes an genomischer DNA in nativen (noV) und dezellularisierten (azellV) Venensegmenten	59
15 Gelelektrophorese aufgereinigter genomischer DNA	60
16 Elastika van Gieson- Färbung einer nativen (a) und einer dezellularisierten Venenwand (b). 200x Vergrößerung	61
17 primäre venöse Zellen in der Vermehrungsphase, 200x Vergrößerung	62
18 Immunhistochemische Färbung mit anti- von Willebrand- Faktor (vW) auf einem EC Zytospot. 100 x Vergrößerung.	63
19 Anteil der von Willebrand positiven Zellen der EC- Zytospots	64
20 UEAI- Färbung eines EC- Zytospots mit DAPI- Kernfärbung. 200x Vergrößerung	65
21 Immunhistochemische Färbung mit anti Desmin auf einem MFb Zytospot. 200 x Vergrößerung	66
22 Anteil an Desmin positiven Zellen der MFb- Zytospots.	66
23 Elastika van Gieson- Färbung eines im Bioreaktor rebesiedelten	

---

	Venensegmentes. 200x Vergrößerung.	70
24	H&E- Färbung rebesiedelter (a) und nativer (b) Venensegmente. a = 100x Vergrößerung; b = 200x Vergrößerung	71
25	Immunhistochemische Charakterisierung rebesiedelter Venensegmente	73
26	Autotransplantat eines klappentragenden Venensegmentes nach 4 Wochen Implantation – luminale Ansicht des Explantates.	75
27	Übersichtsfärbungen der Autotransplantate	76
28	Von Kossa- Färbung einer Autotransplantates, 200x Vergrößerung	76
29	Leukozytennachweis mit CD11 b an den Gefrierschnitten der Autotransplantate und einer ovinen Milz- Kontrolle	77
30	Immunhistochemische Charakterisierung der Endothel- und glatten Muskelzellen der Autotransplantate. 100x Vergrößerung	78
31	Prokollagen Typ I- Markierung eines Autotransplantates im Vergleich mit einer nativen ovinen Vene mit M38. 100x Vergrößerung	78
32	Azellulär implantierte klappentragende Venensegmente – luminale Ansicht der Explantate.	79
33	H&E- Färbung azellulär implantierter Venensegmente nach der Explantation.	82
34	Elastika van Gieson- Färbung der azellulären Explantate nach 1 und 6 Wochen.	83
35	von Kossa- Färbung eines azellulär implantierten Segmentes – Kalzifizierungsnachweis. 200x Vergrößerung	84
36	Immunhistochemische Charakterisierung azellulär implantierter Venensegmente nach der Explantation.	87
37	In vitro rebesiedelte implantierte klappentragende Venensegmente – luminale Ansicht der Explantate.	88
38	H&E- Färbung der in vitro rebesiedelten Explantate nach 1 und 6 Wochen Implantation	91
39	Elastika van Gieson- Färbung der in vitro rebesiedelten Explantate nach 1 und 6 Wochen Implantation	92
40	Von Kossa- Färbung eines in vitro rebesiedelten Explantates nach 6 Wochen Implantation – Kalzifizierungsnachweis. 200x Vergrößerung	93
41	Immunhistochemische Charakterisierung der in vitro rebesiedelten Explantate nach 6 Wochen Implantation.	96

---

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle</b>	<b>Seite</b>
1 Übersicht über die wichtigsten Kollagen- Typen und ihr Vorkommen im Säuger- Organismus	14
2 Getestete Zelldichten in zweidimensionaler Rebesiedlung	38
3 Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper	43
4 Übersicht über die Versuchstiergruppen	49
5 Übersicht über die verschiedenen Methoden, die für die Dezellularisierung von klappentragenden Venensegmenten getestet wurden	57
6 Photometrische Bestimmung des DNS- Gehaltes in nativen ovinen Venen (noV) und dezellularisierten Venen (azell)	58
7 Anpassung der Zelldichten von EC und MFb in einer zweidimensionalen Besiedlung	68
8 Immunhistochemische Charakterisierung der rebesiedelten Venensegmente	72
9 Übersichtsfärbungen der azellulär implantierten Venensegmente nach der Explantation	81
10 Immunhistochemische Charakterisierung der azellulär implantierten Venenklappensegmente nach der Explantation	86
11 Übersichtsfärbungen der rebesiedelt implantierten Venensegmente nach der Explantation	90
12 Immunhistochemische Charakterisierung der in vitro rebesiedelten implantierten Venenklappensegmente nach der Explantation	95

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Ich versichere weiterhin, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, den 10.06.02

Carmen Katharina Kleczka

**Lebenslauf**

Name: Carmen Katharina Kleczka

Anschrift: Podbielskistraße 74  
30177 Hannover

geboren am: 23.04.1974 in Hannover

Familienstand: ledig

Eltern: Berthold Kleczka, Versicherungskaufmann  
Hannelore Kleczka, geb. Pischke, Steuerberaterin

Staatsangehörigkeit: deutsch

**Schulausbildung:**

August 1980- Juni 1984 Friedrich- Ebert Grundschule in Langenhagen

August 1984- Juni 1986 Orientierungsstufe Hindenburgstraße,  
Langenhagen

August 1986- Mai 1993 Gymnasium Konrad- Adenauer- Straße,  
Langenhagen

Schulabschluß: Abitur

**Studium:**

Oktober 1993- Juli 1996 Grundstudium Biologie an der Universität  
Hannover, Vordiplomsprüfungen in den Fächern:  
Zoologie, Botanik, Chemie und Physik

Oktober 1996- April 1999 Hauptstudium Biologie an der Universität  
Hannover, Diplomhauptprüfung in den Fächern:  
Zoologie, Mikrobiologie, Biophysik und  
Parasitologie

Mai 1999- März 2000 Diplomarbeit im Fachgebiet für Fischkrankheiten  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover mit dem  
Thema: „Aktivierung von Phagozyten aus  
Karpfen (*Cyprinus carpio*) durch den  
Blutflagellaten *Trypanoplasma borreli*“

Seit April 2000: Doktorandin im Leibniz Forschungszentrum für  
Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO),  
Medizinische Hochschule Hannover

Fremdsprachenkenntnisse: Latein, Englisch

---

## Danksagung

### Ich danke:

...Professor Dr. Axel Haverich für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit, auch in Zukunft an diesem interessanten Projekt weiterarbeiten zu können.

..ganz besonders Frau Dr. Heike Mertsching für die Betreuung und die zahlreichen anregenden Diskussionen.

...dem Team der experimentellen Chirurgie um Adine Timke für die Organisation im Tier-OP: Karin Peschel, Petra Ziehme, Rosi Katt, Astrid Diers-Ketterkatt und Christiane Mörike.

...den Chirurgen Dr. Omke Teebken und Dr. Thomas Aper für die durchgeführten Schaf-Operationen.

...meinen Arbeitskollegen, die mich immer wieder unterstützt haben, und mit denen die Zusammenarbeit ganz einfach Spaß macht: Karin Burgwitz, Tanja Herden, Astrid Oberbeck, Dr. Sven Wagner, Dr. Bettina Sohns, Petra Wübbolt- Lehmann und Prof. Heiko von der Leyen. ALLES WIRD GUT!

außerdem danke ich: Mona, Lisa, Anna, Emma, Maja, Lucy, Anja, Edda, Nina, Imke, Dora, Thea, Olga, Gesa, Nena, Lene, Toni, Erna, Nora, Zita, Xena, Rita, Elli und Sina.

und ganz besonders Marco, der mich die ganze Zeit unterstützt hat und immer für mich da war.

---