

## **2. In vitro Untersuchungen an Endothelzellbeschichteten Herzklappen**

Die folgenden Arbeiten behandeln die Entwicklung eines geeigneten Tiermodells für präklinische in vivo Untersuchungen sowie die hämodynamische in vitro Testung des Herzklappengerüsts.

Das Modell „juveniles Schaf“ wird im Bereich kardiovaskulärer Implantate wegen der ausgeprägten Reaktion gegen jegliches Fremdimplantat zur Erforschung der Biokompatibilität am häufigsten angewandt (44,45). Dieses Modell wird für herkömmliches Herzklappengewebe oder Gefäßprothesen verwendet. Es ergibt sich jedoch die Frage, ob in diesem Modell auch kardiovaskuläre Implantate, die mit Techniken des Tissue Engineering hergestellt wurden, untersucht werden können. In einer Übersichtsarbeit wird gezeigt, welche Möglichkeiten das Schafmodell hierbei bietet (*Veröffentlichung 2.1*).

Unter standardisierten Herstellungsmethoden wurden verschiedene Gerüste geschaffen, die autologe Zellen tragen können, und in verschiedenen Positionen implantiert. Es zeigte sich, dass das Modell „juveniles Schaf“ für die Evaluation kardiovaskulärer Implantate, die mit Techniken des Tissue Engineering hergestellt wurden, eingesetzt werden kann. Schwerpunktmäßig wird in dieser Arbeit der Einsatz eines Pulmonalklappengerüsts dargestellt.

Nachdem ein geeignetes Tiermodell etabliert war, wurde in einer weiteren Versuchsreihe zur Logistik beim Tissue Engineering geprüft, ob es möglich ist, aus Venensegmenten neugeborener Schafe Endothelzellen zu gewinnen. Dazu wurden diese über eine längere Strecke transportiert, um die räumliche Entfernung zwischen implantierendem Krankenhaus und Zellzuchtlabor zu simulieren. Wichtig ist hierbei, dass durch den Transport weder Wachstumspotential noch Viabilität beeinträchtigt werden (*Veröffentlichung 2.2*).

Parallel dazu wurde in vitro die hämodynamische Funktion der dezellularisierten Herzklappenmatrix untersucht. Diese sollte möglichst physiologischen Normalwerten entsprechen (*Veröffentlichung 2.3*).

2.1. *Dohmen PM, da Costa F, Lopes SV, Pohl F, de Oliveira GL, Vilani R, Wouk F, Konertz W. The juvenile sheep model for evaluation of tissue engineered cardiovascular grafts. LA Arch Cardiovasc Sci 2003;4:45-53.*

Bei der Erforschung der Biokompatibilität kardiovaskulärer Implantate wird das Modell „juveniles Schaf“ wegen der ausgeprägten Reaktionen gegen Implantate am häufigsten verwendet.

Die Arbeit behandelt die Frage, ob es in diesem Modell möglich ist, autologe Zellen zu gewinnen und diese in kurzer Zeit in vitro so zu vermehren, dass damit Implantate besiedelt werden können.

In dieser Übersichtsarbeit wird das Experimentalmodell im Detail beschrieben. Verschiedene Implantate, die mit Techniken des Tissue Engineering hergestellt wurden, konnten untersucht werden. Dazu wurden sie in verschiedenen Positionen implantiert, und so unter unterschiedlichen hämodynamischen Bedingungen getestet. Es zeigte sich, dass es möglich ist, die gewonnenen Endothelzellen in kurzer Zeit so zu vermehren, dass eine ausreichende Zahl von Zellen zur Verfügung steht um ein Klappengerüst zu beschichten. Gleichzeitig wird eine standardisierte Herstellungsmethode für verschiedene kardiovaskuläre Implantate beschrieben.

Mit dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass mit dem Modell „juveniles Schaf“ Implantate, die mit autologen Zellen besiedelt wurden, getestet und die Ergebnisse mit anderen Implantaten verglichen werden können. Dies ermöglicht es, Herzklappen, die mit Methoden des Tissue Engineering hergestellt werden, mit herkömmlichen Bioprothesen zu vergleichen um so eine Einschätzung der Eigenschaften dieser Implantate zu gewinnen.

2.2. *Dohmen PM, Meuris B, Flameng W, Konertz W. Influence of ischemic time and temperature on endothelial cell growth after transport. Int J Artif Organs 2001;24:281-285.*

In dieser Tierversuchsserie wurde untersucht, ob im Zellzuchtlabor nach einem längeren Transport aus Venensegmenten Endothelzellen isoliert, charakterisiert und expandiert werden können. Für die Züchtung dieser Endothelzellen wurden von acht neugeborenen Schafen 14 Venensegmente entnommen und auf 4°C (n=6) und 25°C (n=8) temperiert. Sie wurden verschiedenen Ischämiezeiten ausgesetzt um zu sehen, ob dies einen Einfluss auf das Überleben dieser Zellen und deren Wachstumspotential in vitro hat. 4°C wurde gewählt, um eine Absenkung des Metabolismus und der biochemischen Reaktionen zu erreichen. Andererseits können durch tiefe Hypothermie intrazelluläre Veränderungen wie Azidose oder Schwellung auftreten. Deshalb wurden von den gleichen Tieren andere Venensegmente bei 25°C transportiert. In einer weiteren Untersuchung wurden Endothelzellen tiefgefroren und gelagert um den Einfluss auch dieser Maßnahme auf Überleben und Wachstumspotential zu evaluieren.

Es wurde gezeigt, dass tiefe Hypothermie (4°C) einen negativen Einfluss auf das Wachstumspotential der in vitro gezüchteten Endothelzellen hat. Eine Ischämiedauer von bis zu 24 Stunden konnte durch die Anwendung von gepuffertem Medium gut überbrückt werden. Kontrolliertes Einfrieren zeigte ebenfalls keinen negativen Einfluss auf das Wachstumspotential der Endothelzellen.

Venensegmente von neugeborenen Schafen können also im gepufferten Medium bei 25°C ohne negativen Einfluss über weite Strecken transportiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre die Gewinnung der Endothelzellen vor Ort und das Verschicken der tiefgefrorenen Venensegmente ins Zellzuchtlabor. Diese Untersuchungen sind wichtig, da mit der klinischen Anwendung von Tissue Engineering neue logistische Aufgaben und Konzepte verwirklicht werden müssen.

2.3. Dohmen PM, Scheckel M, Stein-Konertz M, Erdbruegger W, Affeld K, Konertz W.

*In vitro hemodynamics of a novel three leaflet heart valve. Int J Artif Organs*

2002;25;1089-94.

Im Rahmen der Entwicklung eines besiedlungsfähigen Herzklappengerüsts, wird eine Matrix benötigt, die optimale hämodynamische Funktion bietet. Diese Matrix ist der zentrale Baustein der neuartigen Herzklappe und daher müssen *in vitro* Funktionsparameter evaluiert werden. Dabei ist es wichtig, dass die Matrix unter physiologischen Verhältnissen belastet wird um so die hämodynamische Funktion der Herzklappenmatrix zu ermitteln. Funktionsparameter wie Druckgradienten und Leckvolumina sind von zentraler Bedeutung. Diese werden mit Herzklappen, die routinemäßig in der Herzchirurgie verwendet werden, verglichen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die dezellularisierte Klappenmatrix einer Polyurethan-Herzklappe gleichwertig ist und signifikant besser als eine glutaraldehydfixierte Herzklappe abschneidet. Sowohl die Druckgradienten als auch die Volumina, die benötigt wurden, um die Herzklappe zu schließen, sind minimal, was auf eine hohe Elastizität der Klappensegel schließen lässt.