

Seite 1

Aus der Klinik für
Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Pilotstudie zum in-vivo Verhalten von unter Fluss endothelialisierten Kollagenmatrix-Gefäßprothesen im Schweinmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Ines Fitschen
aus Köln

Gutachter: 1. PD Dr. med. J.W. Mall

2. PD Dr. med. T. Volk

3. PD Dr. med. R. Pfitzmann

Datum der Promotion: 17. Dezember 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Einführung.....	7
1.2	Struktur und Morphologie von Gefäßen.....	9
1.3	Ursachen von Prothesenverschlüssen	11
1.4	Eigenschaften einer funktionierenden Gefäßprothese	12
1.5	Tissue Engineering.....	13
	1.5.1 Bioreaktoren	14
1.6	Endothelialisierung und Beschichtung der Prothesen	14
1.7	Kollagen.....	16
	1.7.1 Kollagen Eigenschaften und Funktionalität	16
	1.7.2 Kollagen als Prothesenmaterial	16
1.8	Zielstellung.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Versuchsaufbau	19
	2.1.1 Struktur und Aufbau der Kollagenmatrix-Gefäßprothese.....	19
	2.1.2 Auswahl der Tiere.....	20
	2.1.3 Haltung der Tiere.....	20
	2.1.4 Vorbereitung zur tierexperimentellen Studie	20
	2.1.5 Anästhesie.....	21
2.2	Vorversuche	21
2.3	Endothelzellverarbeitung	22
	2.3.1 Zellfärbung	23
	2.3.2 Endothelzell- und Myofibroblastenkultivierung	23
	2.3.3 Zellzahlbestimmung.....	24
2.4	Prothesenbearbeitung	24
	2.4.1 Perfusionskammer.....	24
	2.4.2 Funktionsschema der Perfusionskultivierung	26
	2.4.3 Endothelzellbeschichtung und Fibroblastenbeschichtung	27
	2.4.4 Beschichtung der Prothesen unter dynamischen Bedingungen ...	27
2.5	Chirurgische Techniken	29
	2.5.1 Venenentnahme zur Endothelzellgewinnung	29
	2.5.1.1 Anästhesie.....	29
	2.5.1.2 Zugang	29
	2.5.1.3 Wundversorgung.....	30
	2.5.1.4 Implantation	30

2.5.1.5	<i>Implantationsort</i>	30
2.5.1.6	<i>Wundnachsorge</i>	31
2.5.1.7	<i>Ultraschall-Dopplermessungen</i>	31
2.5.2	<i>Prothesenexplantation</i>	32
2.5.2.1	<i>Zugang und chirurgische Technik</i>	33
2.5.2.2	<i>Verbleib des Versuchstiers</i>	33
2.6	Histologische und immunhistologische Untersuchung	33
2.6.1	Immunhistologische Untersuchungen der Explantate	33
2.6.1.1	<i>HE-Übersichtsfärbungen</i>	33
2.6.1.2	<i>Zelltypennachweis</i>	34
2.6.1.3	<i>Kollagen-Typ Nachweis (III und V)</i>	34
3	Ergebnisse	35
3.1	In-vitro Vorversuche	35
3.2	Tierversuch	35
3.2.1	Explantation des Venensegments	38
3.2.2	Isolation und Kultivierung der Endothelzellen und Fibroblasten ...	38
3.2.3	Beschichtung der Prothesen unter dynamischen Bedingungen ...	38
3.2.4	Implantation der Gefäßprothese	39
3.2.5	Ultraschall-Dopplermessungen.....	41
3.2.6	Explantation der Gefäßprothese	44
3.2.7	Histologische und immunhistologische Untersuchungen	46
3.2.7.1	<i>HE-Übersichtsfärbungen</i>	46
3.2.7.2	<i>Zelltypnachweis</i>	49
3.2.7.3	<i>Konfluenzuntersuchung</i>	51
3.2.7.4	<i>Thrombencharakterisierung</i>	51
3.2.7.5	<i>Kollagen Typ-Nachweis (III und V)</i>	52
4	Diskussion	54
5	Zusammenfassung	62
6	Literatur	64
7	Danksagung	73
8	Eidesstattliche Erklärung	74
9	Lebenslauf	75
10	Material und Chemikalien	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema einer dynamischen Kultivierung	9
Abbildung 2: Gefäßstruktur.....	10
Abbildung 3: Roller Unit und Prothesenkammer TCS ^{2C}	25
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prothesenkreislaufs zur Zellbeschichtung von.....	26
Abbildung 5: Pumpregime zur Perfusion der zu beschichtenden Gefäßprothese.....	28
Abbildung 6: Freipräparierte Vene zwecks späterer Entnahme zur Zellisolation (Tier Nr. 100) .	30
Abbildung 7: Sonotron Vingmed CFM-800 (Bild oben) und Sektorschallkopf (Bild unten).....	32
Abbildung 8: Übersichtsbilder zur Beurteilung der Konfluenz der Gefäßprothesen	35
Abbildung 9: Implantierte Prothese.....	39
Abbildung 10 a+b: Dilatation der Arterie	40
Abbildung 11 a-d: Ultraschall Dopplermessung.....	42
Abbildung 12: Tier Nr. 48; Ultraschallmessung am 28.postoperativen Tag	43
Abbildung 13 a+b: Explantation der Gefäßprothese	45
Abbildung 14: Explantat der Kollagenmarix-Gefäßprothese	45
Abbildung 15 Histologisches Bild (HE-Färbung)	46
Abbildung 16 Histologisches Bild (HE-Färbung)	47
Abbildung 17: Histologische Bilder(HE-Färbung).....	47
Abbildung 18a-d: Histologische Bilder (HE-Färbung).....	49
Abbildung 19 a-d: Zelltypnachweis	50
Abbildung 20: HE-Färbung des Längsschnitts des Explantats von Versuchstier Nr. 98 (16x) ...	51
Abbildung 21: Kollagen Typ-Nachweis	52
Abbildung 22 a-d: Kollagen Typ-Nachweis	53
Abbildung 23: Schematische Darstellung der bioartifiziellen Gefäßprothese. Firma Jotec	54
Abbildung 24: Dreidimensionale Gefäßprothese.....	55

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Durchflussraten 14 Tage und 28 Tage nach der Operation 41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften einer funktionierenden artifiziellen Prothese 12
Tabelle 2: Zeitlicher Ablauf des Versuches..... 37
Tabelle 3: Durchflussraten 14 und 28 Tage nach der Operation 41

Abkürzungsverzeichnis

EC	Endothelial cells; Endothelzellen
ECGM	Endothelial cell growth medium
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ePTFE	Expanded Polytetrafluorethylen
HE	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
HVEC	Human Venous Endothelial Cell
L	Länge
MVEC	Microvascular Endothelial Cell
PBS	Phosphat buffered saline; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDL	Population doubling level; Generationszahl
PDT	Population doubling time
PGA	Polyglycolicacid
RGD	Aminosäuresequenz: Arg-Gly-Asp
SIH	Subendotheliale Intimahyperplasie
VTT	Venentransplantat
ZZ	Zellzahl

1 Einleitung

1.1 Einführung

Arteriosklerose assoziierte kardiovaskuläre Erkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit und die periphere arterielle Verschlusskrankheit, stellen mit 16,7 Millionen Todesfällen weltweit die häufigste Todesursache dar. Allein in Europa sind das jährlich 4 Millionen Menschen.¹ ²Arteriosklerose stellt mit 70% die häufigste Ursache dar.³

Als Risikofaktoren für diese Erkrankungen gelten der Diabetes mellitus, Hypertonie, Zigarettenkonsum, Adipositas, Bewegungsmangel und die demographische Entwicklung in der Bevölkerungsstruktur.⁴ Die Mortalitätsrate für kardiovaskuläre Erkrankungen stieg in den letzten 30 Jahren stark an.⁵ In der Behandlung einer koronaren oder peripheren arteriellen Verschlusskrankheit im fortgeschrittenen Stadium besitzen operative Thrombendarteriekтомien und Gefäßersatzverfahren wie die Bypassoperation einen hohen Stellenwert.⁶ Über 500.000 koronare Bypässe und 50.000 periphere Bypassoperationen werden jährlich in Europa und den USA durchgeführt.² Dabei stellt der autologe Gefäßersatz mit einer 5-Jahresoffenheitsrate von 87%, wie die Vena saphena magna oder die Arteria mammaria interna, das Mittel der Wahl dar.⁷ Doch bei 30% aller zu einer Bypassoperation anstehenden Patienten ist autologes Bypassmaterial nicht geeignet oder steht nicht mehr in ausreichender Länge zur Verfügung.⁸ ³

Als Alternative zu dem autologen Gefäßersatz wurden synthetisch hergestellte Prothesen, bestehend aus Dacron oder Polytetrafluorethylen (PTFE), erfolgreich als Gefäßersatz für Bypassverfahren der großkalibrigen Gefäße (> 5 mm) wie der Aorta oder der Arteria iliaca eingesetzt.⁹ Lange Offenheitsraten von kleinkalibrigen Rekonstruktionen mit synthetisch hergestellten Prothesen konnten bisher nicht erzielt werden.

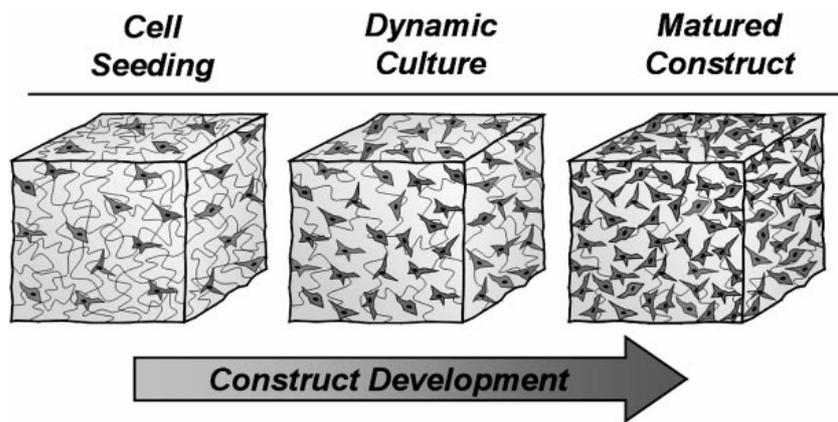
Die 5-Jahresoffenheitsrate für synthetische Prothesen beträgt für die Arteria poplitea 45% und infrapopliteal 20%.^{10 11 12 13 14} Neben diesen Ersatzgefäßen wurden auch Kollagengefäßprothesen entwickelt. Koch und Kollegen zeigten in einer klinischen Vergleichsstudie von synthetischen Prothesen und Schafskollagengefäßprothesen 3-Jahresoffenheitsraten von 65% für den femoropoplitealen Bypass bei Patienten sowie eine geringe Infektionsrate und kaum Aneurysmabildungen.¹⁵ Auch Erasmi et al.¹⁶ zeigten ähnliche Ergebnisse mit Kollagengefäßprothesen im Tierversuch. Bei einer Nachbeobachtungsstudie von 9 Monaten lag die Offenheitsrate für den gelenküberschreitenden iliacofemorale Bypass bei 83%.

In einer Studienreihe von Yoshida et al.¹⁷ wurden gute Ergebnisse primärer Offenheitsraten für supragenuale femoropopliteale Bypässe mit biosynthetischen Schafskollagengefäßprothesen (biosynthetic ovine collagen {RBOC}) erzielt. Dabei lagen die primäre 3-Jahresoffenheitsrate bei 83,7% und die sekundäre Offenheitsrate bei 91,2%. Dennoch sind lange Offenheitsraten von künstlichem Gefäßersatz insbesondere von kleinkalibrigen Gefäßprothesen durch Restenosen limitiert.¹⁸ Die häufigsten Ursachen für Prothesenverschlüsse liegen hauptsächlich in der Ausbildung der subendothelialen Intimahyperplasie (SIH) der distalen Anastomose und der Thrombosierung der Prothese in der Frühphase nach der Prothesenimplantation.^{19 20 21 13} Lange Offenheitsraten eines kleinkalibrigen Gefäßersatzes konnten bisher nicht erzielt werden. Deshalb wurden Verfahren entwickelt, die der Thrombosierung und der SIH vorbeugen sollen.

Ein seit ca. 15 Jahren bekanntes Verfahren ist die Endothelialisierung an der luminalen Seite der künstlichen Prothesenwand.^{22 23} In Tierversuchen wurde gezeigt, dass die Endothelialisierung von kleinkalibrigen Gefäßprothesen die Offenheitsraten verbessern kann.^{24 25} Ein noch nicht vollständig gelöstes Problem ist die geringe Adhäsion der Endothelzellen an der Prothesenwand, um den in-vivo bestehenden hämodynamischen Kräften standhalten zu können. In diesem Zusammenhang zeigten Studien die Wichtigkeit von in-vitro Kultivierungs- und Beschichtungsverfahren.^{9 26 27} In einer experimentellen Studie von Büttemeyer et al.²⁵ wurden unter Fluss endothelialisierte ePTFE Prothesen bereits im Schwein auf ihre Offenheit geprüft. Alle Gefäßprothesen zeigten 6 Wochen nach Implantation eine gute Offenheitsrate.

Die Endothelialisierung kann unter statischen oder dynamischen in-vitro Kultivierungsbedingungen erfolgen.^{28 29} Dynamische Bedingungen können durch Bioreaktoren künstlich erschaffen werden, um eine möglichst physiologische Umgebung zu erreichen. Hier führt die Präexposition der Prothese mit Scherstress zu einer verstärkten Haftung von Endothelzellen (EC) und zu einer besseren Offenheitsrate der Gefäßprothesen.^{56 30}

Auch werden höhere Endothelzellzahlen und eine gleichmäßigere Endothelzellkonfluenz erzielt als unter statischen Bedingungen. Andere Studiengruppen verbesserten die Adhäsion durch die Beschichtung der Bypassinnenseite mit extrazellulären Matrix-Proteinen (ECM).³¹



Entnommen aus: Nerem RM, Seliktar D. Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 2001;3:225–43.³²

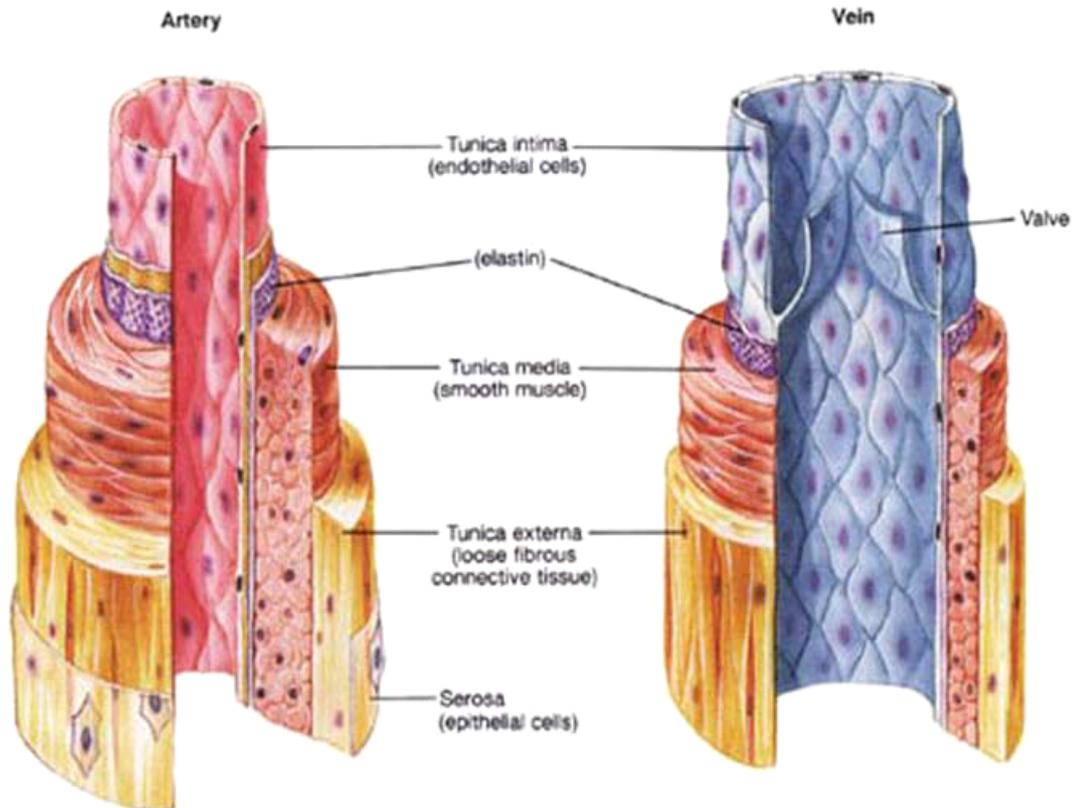
Abbildung 1: Schema einer dynamischen Kultivierung

Aufgrund der Probleme, die mit nativen, synthetischen und biologischen Materialien bzw. Prothesen einhergehen, besteht die Notwendigkeit, kleinkalibrige Gefäßprothesen zu entwickeln, die einem natürlichen Gefäß in Funktionalität und Struktur ähneln.

1.2 Struktur und Morphologie von Gefäßen

Die Rekonstruktion von Gefäßen, speziell der Arterie, erfordert es, die Struktur und Physiologie der Gefäße genau zu betrachten.

Arterien transportieren sauerstoffreiches Blut vom Herzen zu allen Organen des Körpers. Sie reagieren auf physiologische und hämodynamische Reize der Umgebung. Arterien reagieren auf Nervenimpulse, humorale Signale oder hämodynamische Flussgegebenheiten, indem sie ihren Durchmesser variieren und so den Blutfluss regulieren können. Es existieren zwei Typen von Arterien, der elastische und der muskuläre Typ. Die Aorta und andere große Gefäße haben eine starke elastische Komponente, um hohen Drücken stand zu halten. Je kleiner die Gefäße, desto stärker dominiert der muskuläre Typ der Arterien. Alle Gefäße besitzen den gleichen Strukturaufbau, obwohl die Variabilität der Komponenten den verschiedenen physiologischen Bedingungen angepasst ist. Arterien bestehen grundsätzlich aus drei Schichten. Der zum Lumen zugewandten Intimaschicht folgt die Media und außen befindet sich die Adventitia.³³



Source: Fox, Stuart I. Human physiology 4th edition, Brown Publishers

Entnommen aus Jason Habermehl. *Development and validation of a collagen-based scaffold for vascular tissue engineering.* *Faculté des sciences et de Génie Université Laval, Quebec. 2005:1-63*

Abbildung 2: Gefäßstruktur

Intima:

Die Intima besteht aus einer konfluenten Endothelzellschicht, die das Endothelium bildet. Die Endothelzellen sind parallel zur Flussrichtung ausgerichtet. Diese Schicht ist hämokompatibel und wirkt antithrombotisch.

Media:

Die Media besteht aus glatten Muskelzellen, die konzentrisch zu Kollagen- bzw. Elastinfasern und Proteoglycanen angeordnet sind. Diese Schicht besitzt die stärksten mechanischen Eigenschaften.

Adventitia:

Die Adventitia besteht aus Kollagen und Fibroblasten, die longitudinal zur Flussrichtung verlaufen. Sie bewirkt die Haftung zu anliegenden Geweben und gewährleistet Ernährung und Vaskularisation der weiter innen liegenden Schichten

Extrazelluläre Matrix (ECM):

Die ECM ist eine Komponente der Arterienwand. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagen, Fibrinogen und Elastin. Die ECM der Arterien verstärkt die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Arterienwand, indem sie Stabilität, Elastizität, Widerstand und Dehnung gewährleistet.³⁴ Das Kollagen bewirkt eine starke Spannungskraft und Festigkeit. Elastin gibt dem Gefäß die nötige Elastizität. Diese Proteine spielen auch eine essentielle Rolle für die Funktionalität der Gefäßwand wie Bewässerung, Ionenfiltration und Zellmatrix-Interaktionen.

1.3 Ursachen von Prothesenverschlüssen

Die Ursachen von Prothesenverschlüssen liegen hauptsächlich in der Ausbildung der subendothelialen Intimahyperplasie (SIH) der distalen Anastomose und der Thrombosierung der Prothese in der Frühphase nach der Prothesenimplantation.¹⁹ Die SIH ist eine normale Reaktion von Gefäßen auf die Anastomose zum Transplantat und ist eine der Ursachen für die Entstehung von Restenosen, speziell an der distalen Anastomose der Prothesen.^{35 36} Nach endotheliale Zellschaden kommt es zu einer frühen Thrombosierung des Gefäßes. Durch das Endothel freigesetzte Produkte wird die Proliferation von glatten Muskelzellen, Lymphozyten und Makrophagen begünstigt, die von der Media in die Intima einwandern. Zusätzlich trägt auch die Proliferation von Fibroblasten und Kollagenfibrillen zur SIH bei. Diese sind wesentlich an der Entstehung der SIH beteiligt.³⁷ Die Pathogenese der SIH und der Thrombenbildung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.^{35 38}

In diesem Zusammenhang sollen die Compliance der Prothese - definiert durch die Viskosität des Blutes, Blutvolumen und Durchmesser des Gefäßes - und das Compliance-Mismatch zwischen dem Transplantat und der Empfängerarterie eine wichtige Rolle für die Offenheitsrate des Transplantats spielen.³⁹ Insbesondere das Compliance-Mismatch, das das biomechanische Verhalten von Prothese und Gefäß beschreibt, soll an der distalen Anastomose durch hämodynamische Faktoren, wie niedrige Wand-Scherraten, niedrige und hohe Strömungsgeschwindigkeiten und Turbulenzen die SIH in der Anastomosenregion beeinflussen und fördern.^{19 40 41}

Des Weiteren könnte das Fehlen von EC auf den Gefäßprothesen die Entstehung der SIH fördern.⁴² Durch das Fehlen wachstumsinhibierender Mediatoren des Endothels ist von einer lokalen Dysregulation in der Wachstumskontrolle auszugehen.^{43 44 45 46 47 48}

Für die hohe Thrombosierungsneigung der Prothesen werden als mögliche Ursachen die gerinnungsfördernden Eigenschaften der Protheseninnenfläche und somit das Fehlen einer konfluenten Endothelzellauskleidung auf der Prothesenoberfläche diskutiert. Die Thrombenbildung scheint vor allem in der Frühphase der Prothesenimplantation für den Bypassverschluss verantwortlich zu sein.⁴⁴

1.4 Eigenschaften einer funktionierenden Gefäßprothese

Die Arterie ist ein komplex aufgebautes und funktionierendes Organ. Deshalb sollte eine Prothese zur Rekonstruktion eines Gefäßes Eigenschaften aufweisen, die einer natürlichen Arterie in Struktur und Funktionalität ähneln.

Biologische Eigenschaften	Mechanische Eigenschaften	Kommerzielle Eigenschaften	Physikalische Eigenschaften
<ul style="list-style-type: none"> • Gute Biokompatibilität (nicht inflammatorisch, nicht toxisch, nicht immunogen) • Eine konfluente, adhärenente Endothelschicht, die antithrombotisch wirkt und dem Scherstress in-vivo standhalten kann • Geringe Thrombogenität • Biostabilität • Infektionsresistenz 	<ul style="list-style-type: none"> • Stärke und Festigkeit, um starken Drücken in-vivo standhalten zu können • Elastizität • Compliance • Gut geeignetes Material zum Nähen 	<ul style="list-style-type: none"> • Günstig in der Herstellung • Kurze Zeitspanne zwischen dem Bedarf und der Implantation • Kann individuell genutzt werden (Länge und Durchmesser) 	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Porosität für den Heilungsprozess und die Angiogenese

(Ergänzt übernommen aus Thomas AC, Campbell GR, Campbell JH. Advances in vascular tissue engineering. Cardiovasc Pathol 2003 Sep-Oct;12(5):271-6.

Tabelle 1: Eigenschaften einer funktionierenden artifiziiellen Prothese

Die Biokompatibilität beschreibt die Eignung eines Materials, sich den physiologischen Bedingungen des Körpers anzupassen. Eine inflammatorische oder toxische Reaktion des Körpers auf das Implantat sollte unterdrückt werden, um eine Transplantatabstoßung zu vermeiden. Auch die Aktivierung des Immunsystems oder der Gerinnungskas-

kade führt zu einem verlangsamten Heilungsprozess und zu einer schlechteren Integration des Implantats in die umliegenden Strukturen des Körpers. Durch die Gewährleistung einer adäquaten Porosität der Gefäßprothese können der Heilungsprozess und die Angiogenese unterstützt werden. Das Endothel als vasoaktive selektiv permeable Barriere und als sekretorisches Gewebe besitzt diese Eigenschaften, so dass eine Endothelialisierung die Offenheitsrate verbessern könnte. Außerdem sollte ein gut funktionierender Gefäßersatz den hämodynamischen Flussbedingungen in-vivo standhalten können. Das könnte durch die in-vitro Endothelialisierung unter dynamischen Bedingungen gewährleistet werden.⁶

Durch die elastische Komponente können natürliche Gefäße sich den Flussbedingungen des kardiovaskulären Systems anpassen.

Eine funktionierende Prothese sollte folgende Komponenten aufweisen:

- Ein Gerüst
- Eine Matrix
- Eine Endothelschicht⁴⁹

Ein Gerüst wird benötigt, um der Prothese insgesamt Form und Stärke zu verleihen und um den Zellen die Möglichkeit zu geben, anhaften zu können. Die Matrix verstärkt die Adhäsion und Proliferation der EC auf der Innenoberfläche der Prothese. Schließlich ist ein Endothelzellmonolayer wichtig, um eine glatte antithrombotische Oberfläche zu gewährleisten, die mit dem zirkulierenden Blut interagiert. Zur Herstellung einer Gefäßprothese, die in ihren Eigenschaften einem nativen Gefäß ähneln soll, müssen optimale physiologische Bedingungen gewährleistet sein. In den letzten Jahren konnten Bioreaktoren entwickelt werden, die die Entwicklung von Gefäßprothesen optimieren und vereinfachen. In diesem Zusammenhang hat der Begriff des Tissue Engineerings immer mehr an Bedeutung gewonnen.

1.5 Tissue Engineering

Das Tissue Engineering ist ein Verfahren, das Prinzipien aus technischen und Ingenieurdisziplinen mit medizinischen, chemischen und molekularbiologischen Erkenntnissen vereinigt. Es setzt sich zum Ziel, Ersatzmaterialien zu entwickeln, die dem Erhalt und der Verbesserung von Gewebefunktionen dienen.^{50 51} Für die Entwicklung so genannter *tissue engineerter* Konstrukte - wie Gefäßprothesen - wurden Bioreaktoren entwickelt.

1.5.1 Bioreaktoren

Mit Bioreaktoren können in-vitro Bedingungen zur Herstellung von bioartifiziellen Geweben geschaffen werden. Durch die Erzeugung einer dynamischen Umgebung können die Konstrukte mit Sauerstoff, Wachstumsfaktoren und Zellkulturmedium versorgt werden. Parallel dazu werden sie biomechanischen Bedingungen (Druck, Fluss, und Dehnung) ausgesetzt, die die Gewebebildung fördern. Ziel ist es dabei, die Struktur des Gewebes und die biomechanischen Eigenschaften des Konstruktes zu verbessern.^{52 53} Zellkultivierungs- und Beschichtungsverfahren der Prothesen können so unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden. Die Entwicklung von Gefäßprothesen, die dem Aufbau und der Funktionalität von nativen Gefäßen ähneln, kann damit erheblich vereinfacht werden.

1.6 Endothelialisierung und Beschichtung der Prothesen

Ein anerkanntes Verfahren zur Verbesserung der Offenheitsraten von kleinkalibrigen Gefäßprothesen ist die Endothelialisierung der Innenoberfläche von Gefäßprothesen. Die Endothelzellen garantieren strukturelle Integrität durch Bildung einer permeablen und antithrombotischen Barriere zwischen dem Blut und der Arterienwand.⁵⁴ Endothelzellen der nativen Gefäße, als Schnittstelle zwischen dem Blutstrom und dem umgebenden Gewebe, sind wichtige Regulatoren des Gefäßsystems.²⁸ Das Endothel kontrolliert den Blutfluss und den Gefäßtonus sowie die Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten. Außerdem beeinflusst es die Leukozytenadhäsion sowie die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen. Sie sind in vielen physiologischen und biomechanischen Prozessen wie Angiogenese, Inflammation und Prävention von thrombotischen Ereignissen involviert.⁵⁵

Sie regulieren physiologische und pathophysiologische Vorgänge. Die Homöostase des vaskulären Systems wird durch die Produktion von Prokoagulantien und Antikoagulantien, Vasodilatoren (z.B. NO), Vasokonstriktoren (z.B. ET-1), Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF), Wachstumsinhibitoren (z.B. Heparin) und Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1) sowie Chemotaxane (z.B. MCP-1) aufrechterhalten.⁵⁶ Dem Endothelium wird in diesen regulatorischen Mechanismen eine bedeutende Funktion beigemessen. Ein entscheidendes Problem der Endothelzellaussaat ist die Haftung der EC auf der Protheseninnenoberfläche. Dabei besteht nur eine sehr schwache Adhärenz der Endothelzellen auf dem Prothesenmaterial. In-vivo führt ein Blutdurchfluss der Prothese zu einer Ablösung

der Zellen, einer totalen Endothelzellausschwemmung sowie zu einer Aktivierung der Gerinnung und Immunabwehr.^{57 22}

Unter physiologischen Gegebenheiten haften EC an der Gefäßwand mit ausreichender Stärke, um der Kraft des so genannten Wandscherstresses standzuhalten. Die adhäsive Stärke erklärt sich durch Zell-Matrix Interaktionen. Endothelzellen exprimieren Zelladhäsionsproteine (Integrine), zu denen Fibronectin, Vitronectin, Kollagen, Thrombospondin, Elastin sowie Laminin gehören und die Zellhaftung unterstützen.⁵⁷

Herring et al.⁴⁵ waren die ersten Beschreiber der Endothelialisierung von Dacron-Prothesen. Klinische Anwendung fanden bereits endothelialisierte ePTFE-Prothesen als Koronarbybässe und periphere Bybässe. In einer Studie von Laube et al.²⁶ wiesen diese Prothesen gute Ergebnisse in ihrer Funktionalität auf. Charakteristisch waren die Bildung einer Neointima aus glatten Muskelzellen und einer einschichtigen Endothelzellschicht. In Studien wurde deutlich, dass die Vorbehandlung der Protheseninnenoberfläche mit verschiedenen Substraten, wie Fibronectin oder Kollagen die Haftung des Endothels auf der Oberfläche verbessern.^{58 59} Auch die Vorbehandlung der Zellen mit chronischem Scherstress vor der Implantation der Prothese verstärkt die Zellretention. Sie reduziert möglicherweise die Inzidenzrate früher Thrombogenität und der SIH.⁴⁷ Es wurde demonstriert, dass bis zu 70% der Endothelzellen nach der Exposition von Blutfluss verloren gehen können.⁶⁰ Dardik et al.^{56 58} zeigten, dass die Zelldichte auf dem Gefäßprothesenlumen, die nicht Scherkräften ausgesetzt waren, geringer war als die mit der Vorbehandlung von Scherstress. Scherstress stellt einen wichtigen Faktor zur Modifizierung der physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der Endothelzellen dar. Die auftretenden Veränderungen liegen auf der morphologischen Ebene, gekennzeichnet durch eine Ausrichtung der Endothelzellen in Strömungsrichtung. Die resultierende Verringerung des Stömungswiderstandes der Zelle führt durch die Veränderungen des Zytoskeletts und die Expressierung von Zellverankerungsproteinen zu einer erhöhten Zelladhäsion. Andererseits kann auf molekulargenetischer Ebene eine Beeinflussung des funktionellen Endothelzellenstatus durch Scherkräfte demonstriert werden.^{61 62 63 64 47} Von besonderem Interesse bei der Gefäßprothesenbeschichtung ist dabei die Erhöhung der antithrombotischen Eigenschaften durch eine verbesserte Zelladhärenz auf der Protheseninnenoberfläche.

1.7 Kollagen

1.7.1 Kollagen Eigenschaften und Funktionalität

Kollagen ist ein natürliches Polymer, das in Knochen, Haut, Sehnen und Knorpel vorkommt. Auch die Arterien - insbesondere die muskulären Typen - weisen einen hohen Anteil an Kollagen auf. Blutgefäße bestehen zu 60% aus Typ1-Kollagen und zu 30% aus Typ3-Kollagen. Kollagen ist eines der wichtigsten Strukturproteine des Körpers. Es gewährleistet den Geweben Stärke und Stabilität. Das Kollagen ist an vielen Funktionen- wie die Migration, das Zellwachstum und Interaktionen von Proteinen und Proteoglykanen beteiligt. Bislang konnten 26 verschiedene Kollagentypen identifiziert werden. Die Basis des Kollagens bildet eine aus 3 Polypeptidketten bestehende Tripelhelix. Die wichtigsten faserformenden Kollagen-Typen sind Typ I, II, und III Kollagen, die 70% des Körperkollagens ausmachen.³⁴

1.7.2 Kollagen als Prothesenmaterial

Das Kollagen verleiht den Gefäßen - als ihr biologischer Bestandteil - Stärke und Festigkeit. Es ist bekannt, dass Kollagen kaum inflammatorisch und antigen wirkt.⁶⁵ Im Folgenden sind die Vorteile und Nachteile des Kollagens für die Entwicklung einer biokompatiblen Gefäßprothese dargestellt:

Vorteile:

- hohe Verfügbarkeit und relativ einfach in der Gewinnung,
- wenig antigen
- nicht toxisch und biokompatibel
- Spannungskraft
- gering inflammatorisch
- kontrollierte Bioabbaubarkeit

Nachteile:

- hohe Kosten der Verwertung von Kollagen Typ1
- hoch thrombogen
- mögliche Übertragung von Krankheiten wie z.B. Kreuzfeld-Jacob Erkrankung (durch tierisches Kollagen)⁶⁶

Der größte Widerstand der Gefäße gegenüber hämodynamischen Drücken resultiert aus dem Vorhandensein von glatten Muskelzellen, Kollagen- und Elastinfasern. Kollagen beugt zudem Gefäßrupturen vor, hat gute mechanische Eigenschaften und kann als Gerüst für die Aussaat von Endothelzellen verwendet werden.⁶⁷

Es ist beschrieben, dass Typ1-Kollagen eine schnellere endotheliale Haftung an Membranen und das Wachstum von EC begünstigt.⁶⁸ Kollagen ist wie bereits erwähnt, ein nativer Bestandteil von endothelialen Zellmatrices, das als Adhäsionsprotein die Zellhaftung und die Proliferation von Zellen ermöglicht. Diese wird durch spezifische Interaktionen zwischen der Aminosäuresequenz der Arg-Gly-Asp (RGD) in Kollagenmolekülen und Integrinen in der Zellmembran begünstigt.⁶⁹ Ihr spezifisches Bindungsvermögen resultiert in einem fokalen Kontakt der Zellen zum Substrat, das wiederum die Zellhaftung und die Zellbewegung begünstigt.

Aufgrund der mechanischen und biologischen Eigenschaften und seiner guten Biokompatibilität erweist sich Kollagen für die Entwicklung von biomedizinischen Ersatzmaterialien wie Gefäßprothesen als besonders geeignet.

1.8 Zielstellung

Das Ziel dieser Pilotstudie ist die experimentelle Untersuchung der Biokompatibilität und Offenheitsrate einer unter Fluss endothelialisierten und mit Myofibroblasten beschichteten Kollagenmatrix-Gefäßprothese im Schweinemodell.

Nachstehend aufgeführte Methoden und experimentelle Untersuchungen wurden zur Prüfung der Kollagenmatrix-Gefäßprothesen vorgenommen:

1. Die Venenentnahme zur Endothelzell- und Myofibroblastenextraktion
2. Die unter dynamischen Bedingungen erfolgte Endothelzell- und Myofibroblastenkultivierung auf der Kollagenprotheseninnenoberfläche bzw. -außenoberfläche
3. Die Implantation der Gefäßprothesen in die Arteria femoralis superficialis des Schweins
4. Die Durchflussprüfung der implantierten Prothesen im Abstand von 2 und 4 Wochen nach der Implantation
5. Die Explantation der Gefäßprothesen nach 6 Wochen
6. Histologischer Nachweis der Prothesen
 - a) Histologischer Kollagennachweis
 - b) Histologischer Nachweis des Endothels mit HE-Färbung
 - c) Histologischer Nachweis von Thrombenbildungen der zu untersuchenden Prothese

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Die Tierhaltung, die Operationen sowie die Nachbehandlungen und -untersuchungen wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité - Universitätsmedizin am Standort Virchow-Klinikum (in Berlin) durchgeführt. Die Genehmigung zur Durchführung einer tierexperimentellen Studie hat das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit des Landes Berlin unter der Genehmigungsnummer **G0027/04** erteilt. In unserer Pilotstudie wurde auf die methodischen Grundlagen vorheriger Studien der Arbeitsgruppe zurückgegriffen. Diese Beschichtungsverfahren unter dynamischen Bedingungen wurden auf ePTFE-Prothesen bereits angewendet. Das Verfahren der Endothelialisierung unter dynamischen Bedingungen wurde weiterentwickelt und ist ein Bestandteil der jetzigen Studie. Eine detailgenaue Beschreibung der Methodik ist daher wichtig. Der Unterschied liegt im Aufbau sowie in der Beschaffenheit der Prothesen. Bisher wurde eine Kollagenmatrix-Gefäßprothese noch niemals mit Endothelzellen beschichtet. Die Versuchsbeschreibung der etablierten Methode ist notwendig, um Resultate des Beschichtungsverfahrens der bisher noch nicht beschichteten Prothesenart darzustellen.

Alle Operationen fanden in der tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Charité, im Campus Virchow Klinikum (Leiter: PD Dr. med. C. Grosse-Siestrup) statt. Hierbei wurden alle Operationen unter Anleitung eines in der Gefäßchirurgie erfahrenen Operateurs (PD Dr. med. J.W. Mall) nach dem gegenwärtig gängigen gefäßchirurgischen Standard durchgeführt.

2.1.1 Struktur und Aufbau der Kollagenmatrix-Gefäßprothese

Die Kollagenmatrix-Gefäßprothese besteht aus reinem Typ-1 Rinderkollagen. Durch ein von der Firma Jotec GmbH patentiertes Verfahren lassen sich die Porengröße und -ausrichtung spezifisch einstellen. Die Poren verlaufen radial und bilden so ein offenporiges interkonnektierendes System, so dass glatte Muskelzellen von der extraluminalen Seite durch die Poren eindringen können und so sich in der Kollagenmatrix verteilen können. In dieser Kollagenmatrix eingebettet befindet sich ein Polyesternetz. Die Innen-

schicht der Kollagenmatrix ist mit einer Proteinschicht ausgekleidet, die die Prothese primär abdichtet und eine gleichmäßige Oberfläche für die Endothelialisierung bildet.

2.1.2 Auswahl der Tiere

Für die Implantation der Prothesen wurden 9 Schweine der Marke `Deutsche Landrasse` ausgewählt. Zum Operationszeitpunkt wogen alle Tiere durchschnittlich 54 +/- 1,5 kg. Insgesamt wurden 9 Tiere operiert. 6 Tieren wurde jeweils eine beschichtete Kollagenmatrix-Gefäßprothese implantiert. Zur Kontrolle wurde einem Schwein eine beschichtete ePTFE-Prothese und einem weiteren Schwein eine unbeschichtete Kollagenmatrix-Gefäßprothese implantiert. Ein Tier musste nach der Venenexplantation eingeschläfert werden. Ein weiteres starb nach der Prothesenimplantation.

Auch nach Rücksprache mit dem Institut für Biometrie und Statistik der Charité ist die Größe der Kontrollgruppe mit 2 Tieren bei insgesamt 7 Versuchstieren in einer Pilotstudie ausreichend. Eine Pilotstudie ist eine Studie um die Machbarkeit für nachfolgend validierte Studien zu prüfen. Eine statistische Auswertung bei einer Pilotstudie ist aus unserer Sicht nicht sinnvoll.

2.1.3 Haltung der Tiere

Die Tiere wurden zur Eingewöhnungsphase 14 Tage vor Operationsbeginn in einem Gemeinschaftsstall gehalten und gepflegt. Ein in der Tierhaltung qualifiziertes Personal sorgte entsprechend der Tierschutzrichtlinien für die adäquate Versorgung und Pflege der Tiere während des Experiments. Die Unterbringung im 12-stündigem Helldunkel-Rhythmus, Futter und Wasser, Pflege und ausführliche Wundversorgung waren zu jedem Zeitpunkt gegeben. Postoperativ war stets eine adäquate Schmerztherapie mit Fentanylpflaster über 5 Tage gewährleistet.

2.1.4 Vorbereitung zur tierexperimentellen Studie

Alle Tiere erhielten am Tag der Gefäßprothesenimplantation je nach Gewicht eine einmalige Gabe niedermolekulares Heparin i.v. von 2500 IE intraoperativ sowie als Dauerantikoagulation tgl. 100 mg ASS. Vor jeder Operation wurden die Schweine gewaschen, für den jeweiligen Eingriff entsprechend gelagert, an der zu operierenden Stelle rasiert und mit Betaisodona desinfiziert.

2.1.5 Anästhesie

Die Tiere wurden im Tierstall mit 4 mg/kg Azaperon (Stresnil^R, Fa. Janssen) pro kg KG. i.m., 0,05 mg Atropin und 10 mg Ketamin (Ursotamin^R, Fa. Serumwerk Bernburg AG) pro kg KG. i.m. ruhig gestellt. Die Narkose wurde schließlich mit 0,5 mg/kg Etomidat (Etomidat-^RLipuro, Fa. B. Braun, Melsungen) i.v. eingeleitet und nach der Intubation erfolgte die intravenöse Applikation der Muskelrelaxanz 4mg Pancuroniumbromid. Die Beatmung erfolgte mit 40% O₂ + 60% N₂ O + ca. 1,5 - 1,8% Isofluran. Nach Bedarf wurde die Gabe mit 2-4mg Pancuroniumbromid zur Relaxation wiederholt. Die Tiere wurden mit einer Kapnographie und kontinuierlicher Ekg-Ableitung intraoperativ gemonitort.

2.2 Vorversuche

Unter der Leitung von Dr. med. M. Paulitschke wurden alle Arbeitsschritte zur Beschichtung der Kollagenmatrix-Gefäßprothese im Labor der VasoTissue Technologies GmbH durchgeführt.

Ziel der Vorversuche war es, zu überprüfen, inwieweit die Beschichtungstechnologie der VasoTissue GmbH auf die von der Firma JOTEC GmbH entwickelten und für die Versuchsreihen bereitgestellten Kollagenmatrix-Gefäßprothesen anwendbar ist. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob es nach Abschluss des Beschichtungsvorganges zu einer konfluenten Endothelzellschicht kommt. Für die drei geplanten Vorversuche wurden Primärzellkulturen verwendet, die bei der VasoTissue GmbH im Stickstofflager vorrätig und geprüft waren. Die kryokonservierten Zellkulturen wurden gemäß der VasoTissue-eigenen Standardarbeitsanweisung (SOP) aufgetaut und in Kultur gebracht. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellkulturen trypsinisiert und im Kulturmedium resuspendiert, um anschließend auf der Gefäßprothese ausgesät zu werden.

Die Aussaatdichte der Endothelzellen betrug 1 Million/Prothese.

Zur Erzielung einer Gleichverteilung der Endothelzellen über die gesamte Protheseninnenfläche wurde die Perfusionskammer für 4h mit einer Umdrehungs-Geschwindigkeit von 3/h rotiert. Nach der Aussaat der Zellen erfolgte der Einbau der Kammer in den Kreislauf. Durch ein automatisiertes Pumpregime wurde die Pumpleistung in 10er-Schritten halbstündig, beginnend bei 10 %, auf 100 %, erhöht, um dann für weitere 57,5 h bei maximaler Leistung fortgeführt zu werden. Im Anschluss an die Perfusion wurde die Prothese ausgebaut, mit trypanblau angefärbt und anschließend mikroskopiert.

2.3 Endothelzellverarbeitung

Es wurde jeweils ein 5 cm langes Venensegment von der Vena jugularis externa entfernt, nach der Operation in ein geeignetes Transportmedium gegeben und von dem Tier-Operationssaal direkt in das Zellkulturlabor gebracht. Dort wurden alle weiteren Arbeitsschritte zur Bearbeitung der Venenstücke unter der Sterilwerkbank vorgenommen.

Nach der Entnahme der Vene aus dem Transportmedium, wurde diese mit 70%-igen Ethylalkohol besprüht, von beschädigten Segmenten getrennt sowie von anhängender Adventitia durch Nachpräparation befreit.

Schließlich wurde ein Glasrohr mit abgerundeten Öffnungen und einer aufgesetzten Olive beidseitig in das Lumen der Vene eingeführt und mittels Festziehen eines Kabelbinders hinter der Olive fixiert. Durch mehrmaliges Spülen mit PBS wurde das Venensegment von noch vorhandenen Blutbestandteilen befreit, mit Kollagenase-Lösung gefüllt und luftblasenfrei verschlossen. Die Vene mit der Kollagenase-Lösung wurde schließlich auf einer Petrischale in einem Brutschrank für 15 min bei 37° C, 5% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Vene mit Zeigefinger und Daumen behutsam massiert, um die Ablösung der Endothelzellen von der subzellulären Matrix mechanisch zu verstärken. Danach wurden 20 ml PBS in die Vene appliziert und die gesamte Flüssigkeit einschließlich der Kollagenase-Lösung und den abgelösten Zellen in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die gesamte Zellsuspension wurde schließlich für 5 min. bei ca. 400 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand nach dem Zentrifugieren aseptisch entfernt.

Schließlich erfolgte die nochmalige Kollagenase-Inkubation und das Ablösen von Zellen, nunmehr unterhalb der zuvor entfernten Endothelzellschicht, mit dem Ziel, Fibroblasten zu isolieren. Das Zellsediment wurde in einem Endothelzell-Kulturmedium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und in einer vorbereiteten Kulturflasche ausgesät. Die Aufnahme der Kollagenase-Fibroblasten-Suspension erfolgte in einem Zentrifugenröhrchen mit anschließender Neutralisation des Enzyms durch Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium. Nach der Zentrifugation und Resuspendierung im serumhaltigen Kulturmedium erfolgte die Aussaat der Zellen in zwei separaten Kulturgefäßen. Der erste Medienwechsel fand nach 24 Stunden statt. Bei Bedarf wurden die Zellen maximal zweimal passagiert, um eine zu hohe Zelldichte in den Kulturgefäßen zu vermeiden und

dadurch eine maximale Zellausbeute zu erzielen. Innerhalb von 9 Tagen erreichten die Zellzahlen Werte von durchschnittlich $1,7 \times 10^6$ Zellen, die eine Aussaat der Zellen auf den Prothesen ermöglichte, so dass die Fertigstellung der Gefäßprothesen termingemäß zum OP-Termin gesichert war.

2.3.1 Zellfärbung

Zur Verifizierung der Endothelzellen und Fibroblasten vor der Kultivierung erfolgte die Anfärbung der Zellen unter Verwendung des negativ geladenen Farbstoffes Hämatein. Bei Hämatein handelt es sich um ein Oxidationsprodukt des Hämatoxylins. Durch Zugabe von Alaunsalzen entstehen Hämatoxylinlacke, die stark positiv geladen sind und daher zur Anfärbung von Zellkernen verwendet werden. Durch die Erhöhung des pH-Wertes konnte der Übergang von der rot-braunen Farbe in sauren Lösungen (pH 3) zur charakteristischen Blau-Färbung erreicht werden. Die Gewebesegmente wurden bis zur Einstellung der gewünschten Färbintensität 20 Minuten lang gefärbt und anschließend mit Leitungswasser gespült. Zusätzlich erfolgte bei der Zellfärbung mit Hämatoxylin-Eosin ein Gegenfärben der Präparate mit 1%-iger Eosin-Lösung und ein anschließendes Spülen mit Leitungswasser.

2.3.2 Endothelzell- und Myofibroblastenkultivierung

Die Kulturflasche, die die Zellkulturen enthielt, wurde in den CO₂- Brutschrank bei 37°C, und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% bei einer CO₂ Begasung von 5% platziert. Erstmals wurde das Kulturmedium 24 h nach der Endothelzellaussaat und später alle 48 Stunden ausgetauscht. Als Kulturmedium wurden 4 ml ECGM MV2 verwendet. Nachdem eine Subkonfluenz von 80% erreicht war, konnten die Zellen mittels Trypsin/EDTA-in-PBS-Lösung abgelöst, die Zellkultur in dem Brutschrank für 5min bei 37° C inkubiert und nach der Inkubation die Zellablösung mikroskopisch auf interzelluläre Kontakte und Gestalt begutachtet werden. Bei einer nahezu vollständigen Ablösung der Zellen, wurde die Trypsin-Aktivität durch Zugabe von Endothelzell-Kulturmedium neutralisiert, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 400 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Resuspension der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt und in Abhängigkeit der Zellausbeute die Aussaat, die Flaschengröße und das Endvolumen (Zellen & Medium) berechnet. Die Zellen wurden in neue Kulturgefäße ausgesät und die Flasche bis zum Erreichen des Endvolumenwertes mit Endo-

thelzell-Medium aufgefüllt. Die Fibroblastenverarbeitung und Zellzahlbestimmung wurde analog der Endothelzellverarbeitung durchgeführt.

Als Kulturmedium wurde ein für Fibroblasten speziell hergestelltes Fibroblastenkulturmedium verwendet.

2.3.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl konnte mittels Cell-Counter CASY[®]1 (Schärfe System, Reutlingen) ermittelt werden. Außerdem wurden das PDL (population doubling level, Generationszahl) und die PDT (population doubling time, Verdopplungszeit) berechnet.

Die Vermehrung der Primärzellen ist durch ein exponentielles Wachstum gekennzeichnet. Mutterzellen teilen sich in zwei Tochterzellen und daraus ergeben sich aus einer Ausgangszellzahl von N_0 Zellen nach n Teilungen N Zellen mit

$$N = N_0 \cdot 2^n \quad \{\text{Gl. 1}\}$$

und daraus folgt $\lg N = \lg N_0 + n \cdot \lg 2$

und daraus folgt $n = \text{PDL} = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2 \quad \{\text{Gl.2}\}$

$\text{PDT [h]} = t [\text{h}] / \text{PDL}$

Beispielrechnung:

$$N_0 = 100.000 \quad N = 250.000 \quad t = 72 \text{ h}$$

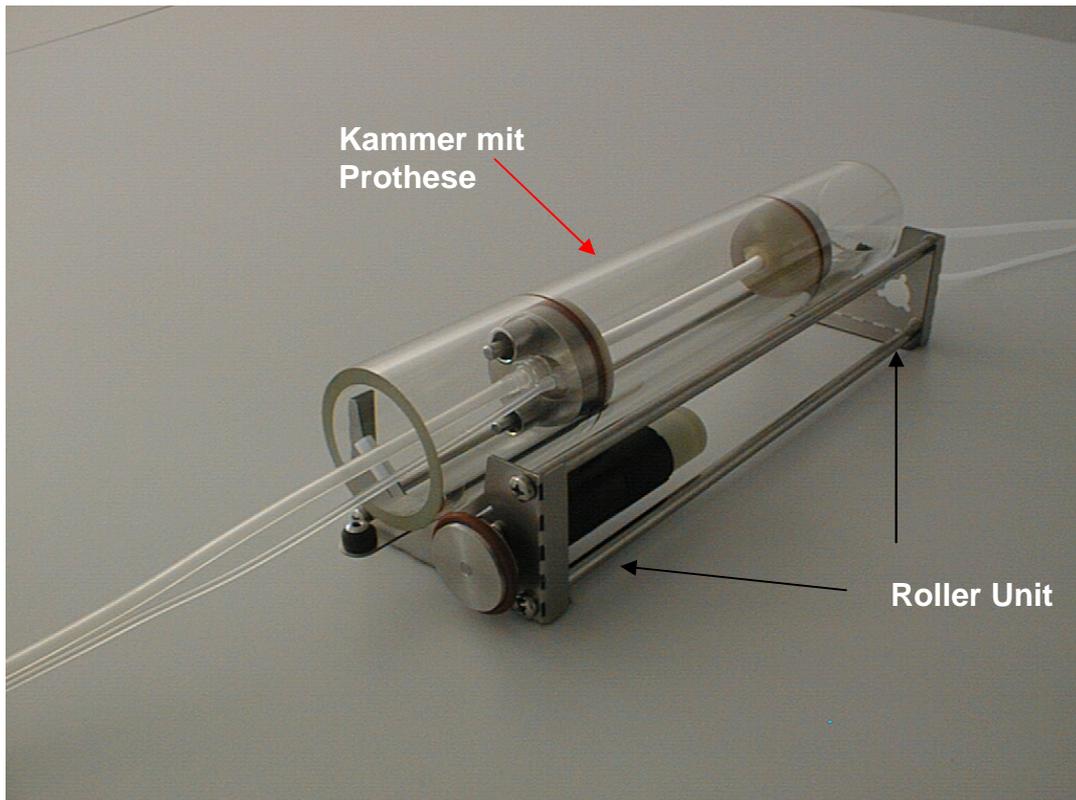
Nach Einsetzen in Gleichung 2 ergibt sich folgendes Ergebnis:

$$\text{PDL} = 1,32$$

2.4 Prothesenbearbeitung

2.4.1 Perfusionskammer

Die Perfusionskammer setzt sich im Wesentlichen aus einem Holzzylinder und zwei Kammerkolben zusammen. Die nicht verschiebbaren Kammerkolben schließen den Holzzylinder von beiden Seiten mittels eines Silikon-O-Rings ab.



© VasoTissue GmbH 1998

Länge der Prothese: 7 cm

Länge der Kammer: 300 mm

Innerer Durchmesser der Kammer: 40 mm

Äußerer Durchmesser der Kammer: 50 mm

Abbildung 3: Roller Unit und Prothesenkammer TCS^{2C}

Ein auf 7 cm zugeschnittenes Prothesensegment wird über einen Adapter an die Kolben angeschlossen, die wiederum durch O-Ringe sicher an der Kammerinnenwand fixiert wurden. Damit ist die Prothese selbst ein Bestandteil des inneren Kreislaufs. Dieser kann nach außen über Luer-Anschlüsse an den Perfusionskreislauf angeschlossen werden.

Zusätzliche radiale Medium Ein- und Auslassöffnungen in den Kolben erlauben eine äußere Umströmung der Prothese zur in-vitro Simulation der Gewebsflüssigkeit. Die Öffnungen sind durch Luer-Anschlüsse an den äußeren Kreislauf angeschlossen. Eine gleichmäßige Verteilung der Endothelzellen auf der inneren Prothesenoberfläche wird durch den zylindrischen Aufbau der Perfusionskammer erreicht, der eine Rotation der Kammer um die Längsachse während der Phase der initialen Besiedlung ermöglicht. Die wichtigsten Elemente des Perfusionskreislaufs (Abb.4) sind der gaspermeable Me-

dienbeutel (zur pH-Stabilisierung des Karbonat/Bikarbonat-gepufferten Kulturmediums) sowie die Rollenpumpe. Zur Erhöhung der Flussraten wurde der Kreislauf vor der Pumpe unter Verwendung von Y-Stücken aufgeteilt, um das Medium parallel durch zwei Pumpschläuche zu fördern. Nach der Pumpe wurden die Pumpschläuche wieder zusammengeführt.

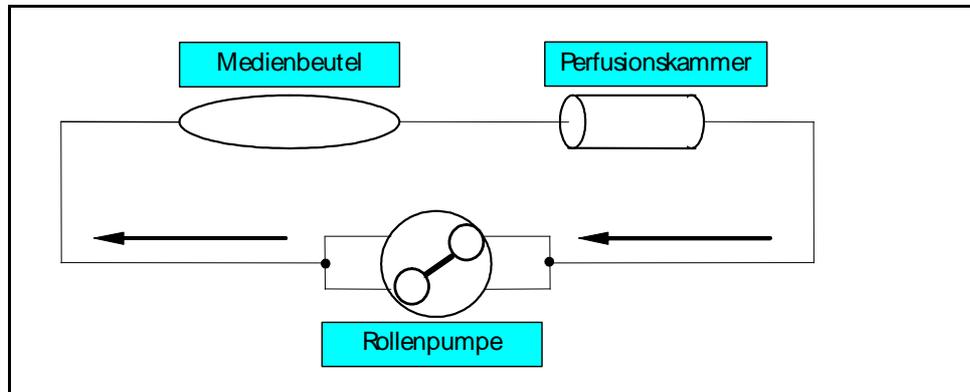


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prothesenkreislaufs zur Zellbeschichtung von Prothesen

Kammer und Medienbeutel befanden sich im Inkubator, die Pumpe außerhalb. Zur Vermeidung von Temperaturschwankungen in der Perfusionsskammer wurde die Strömungsrichtung so gewählt, dass das Kulturmedium zunächst in den Medienbeutel und erst anschließend durch die Kammer gepumpt wurde. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, dass die Schlauchabschnitte außerhalb des Inkubators minimal gehalten wurden.

2.4.2 Funktionsschema der Perfusionskultivierung

Der Perfusionskreislauf besteht aus einem inneren, die Prothese durchströmenden, und einem äußeren, die Prothese umströmenden, Kreislauf. Beide Kreisläufe können unabhängig voneinander betrieben werden. Der innere Kreislauf verbindet den Kammerkolben, der die Prothese enthält, mit der Pumpe und dem Medienbeutel.

Der Medienbeutel ist gaspermeabel und gewährleistet einen Gasaustausch zwischen dem Medium und der Atmosphäre im Inkubator.

Über die gesamte Versuchsdauer soll der statische Druck konstant gehalten werden. Dies wird erreicht, indem das Medienreservoir in identischer Höhe zur Perfusionsskammer platziert wird. Zur Perfusion des Mediums wird eine Rollenpumpe verwendet.

2.4.3 Endothelzellbeschichtung und Fibroblastenbeschichtung

Die zur initialen Beschichtung der Protheseninnenoberfläche benötigte Zelleinsaat wurde auf einen konstanten Wert von 1 Million Zellen/Prothese festgelegt, was in etwa einer 50%-igen Konfluenz entspricht.

Die zur Beschichtung notwendige Gesamtzellzahl der Protheseninnenfläche ist abhängig von der Länge, dem Innendurchmesser der Prothese und der Zelleinsaat. Sie wurde stets neu berechnet. Die Zellen wurden wie beim Kulturmedienwechsel durch Trypsinierung abgelöst, das Zellsuspensat bei 200 xg für 5 min zentrifugiert, das Pellet resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Danach wurde der äußere Kammerraum vollständig mit Endothelzell-Kulturmedium gefüllt, so dass die Prothese von dem Kulturmedium umgeben war.

Die Zellzahl zur initialen Zellaussaat wurde berechnet und ein Zentrifugenröhrchen mit Endothelzell-Kulturmedium auf das errechnete Volumen befüllt. Die Zellsuspension wurde blasenfrei in die Prothese injiziert. Die Fibroblasten wurden als Bolus von 100.000 Zellen in den äußeren Kammerbereich appliziert, der das Kulturmedium zur Umspülung der Prothese enthält und anschließend dicht verschlossen. Die gesamte Perfusionskammer wurde dann bei einer Temperatur von 37° C und einer Umdrehungszahl von 0,3 U/min für 4 Stunden auf einem im Inkubator befindlichen Roller platziert, um so eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Innen- bzw. Außenseite der Prothese zu erzielen. Nach Ablauf der Zeit wurde die Endothelzellsuspension aus der Prothese entfernt und die Zahl der nicht adhärenen Zellen bestimmt. Aus dieser und der Einsaatzellzahl ließ sich die Effizienz der Zellaussaat bestimmen. Die Perfusionskammer wurde dann unter sterilen Bedingungen in den Perfusionskreislauf integriert.

2.4.4 Beschichtung der Prothesen unter dynamischen Bedingungen

Für die initiale Zellbeschichtung wurden die Gesamtzellzahlen, abhängig vom Gefäßdurchmesser und der Prothesenlänge, für jeden Versuch neu berechnet. Die Aussaatdichte der Endothelzellen betrug ca. 1×10^6 Zellen/Prothese. Dies entsprach in etwa einer 50%-igen Konfluenz. Dazu wurde die Zellsuspension in ein entsprechendes Volumen an Kulturmedium aufgenommen, um das innere Lumen der Prothese mit der Zellsuspension aufzufüllen und anschließend dicht zu verschließen. Die Fibroblasten wurden als Bolus von ca. 100.000 Zellen in den äußeren Kammerbereich appliziert, der

das Kulturmedium zur Umspülung der Prothese enthält und anschließend dicht verschlossen wurde. Die initiale Zelladhärenz lag durchschnittlich bei 90%. Im Anschluss an die Aussaat wurde die Kammer auf einen im Inkubator befindlichen Roller platziert. Dieser rotierte die Kammer für die folgenden vier Stunden bei 3 Umdrehungen/h, um so eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Innen- bzw. Außenseite der Prothese zu erzielen. Anschließend wurde die Kammer unter sterilen Bedingungen in den Perfusionskreislauf integriert. Die Messung des Volumenstroms und der daraus resultierenden Scherraten (dyn/cm^2) erfolgten in Abhängigkeit vom Pumpregime. Die Scherraten wurden jede 30 Minuten um $1,5 \text{ dyn/cm}^2$ kontinuierlich erhöht bis sie nach 260 Minuten Werte von 15 dyn/cm^2 erreichten. Nachdem Scherspitzen von 15 dyn/cm^2 erreicht waren, wurde der Volumenstrom über 3 Tage gepulst.

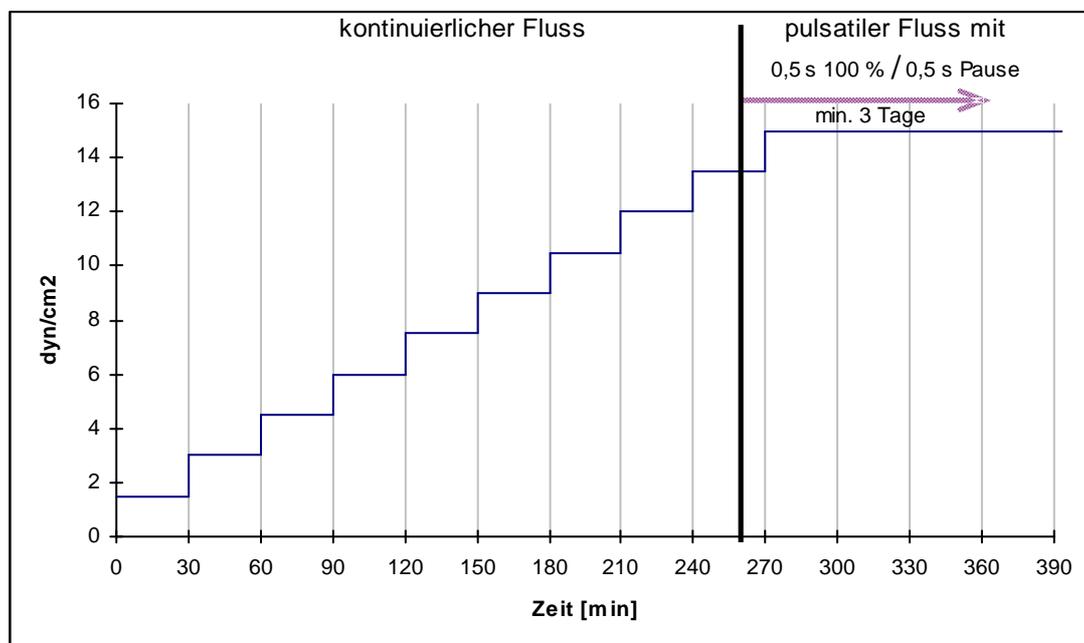


Abbildung 5: Pumpregime zur Perfusion der zu beschichtenden Gefäßprothese

Die Pumpe wurde über eine Software gesteuert. Das Pumpregime ist obenstehender Grafik zu entnehmen (Abb. 5). Die Perfusion bei maximaler Pumpleistung erfolgte über 3 Tage. Mit zunehmender Zellkonfluenz nahm der Mediumspiegel kontinuierlich ab und damit auch das Gewicht der Perfusionskammer. Nach 72h war eine gleichmäßige Konfluenz der Zellen auf der Prothesenoberfläche erreicht. Nach Entnahme der Prothesen aus der Perfusionskammer erfolgte die Überführung in einen Transportbehälter und

schließlich die Präparation der distalen und proximalen Gefäßanschlüsse an der Arteria femoralis superficialis.

2.5 Chirurgische Techniken

2.5.1 Venenentnahme zur Endothelzellgewinnung

Für die Endothelzellgewinnung wurden den Schweinen 5 cm lange Venensegmente der Vena jugularis externa entnommen. Die Explantation der Venensegmente der Vena jugularis externa wurde bei allen Tieren der zu untersuchenden Gruppe komplikationslos durchgeführt. Die Venen wurden im Halsbereich mit einem Durchmesser von ca. 3 mm über eine Strecke von 60 mm frei präpariert. Die durchschnittliche Länge der Venensegmente betrug +/- 5 cm.

2.5.1.1 Anästhesie

Die Anästhesie der Tiere erfolgte wie unter 2.1.5 beschrieben.

2.5.1.2 Zugang

Die Tiere wurden in Rückenlage auf dem OP-Tisch fixiert. Das Operationsgebiet am Hals wurde großflächig rasiert, desinfiziert und steril abgedeckt. Der Operateur setzte einen 7cm großer Schnitt medial des M. sternocleidomastoideus gesetzt. Nach Präparation des Subkutangewebes und der Halsfaszien konnte die Vena jugularis externa freigelegt, ein 7 cm großes Venensegment reseziert und in einen mit Antibiotika und Phosphatpufferlösung gefüllten Transportbehälter überführt werden. Dieser wurde in ein kühltemperiertes Dewargefäß verpackt und zeitnah ins Labor zur Zellisolation gebracht. Nach einer Blutstillung wurde die Wunde zweilagig vernäht, mit einem Wundschutzverband abgedeckt und das Versuchstier anschließend in den Aufwachbereich gebracht. Unmittelbar nach Abschluss der OP wurden die Behälter mit den Venensegmenten in die Labore der VasoTissue GmbH zur weiteren Bearbeitung transportiert.

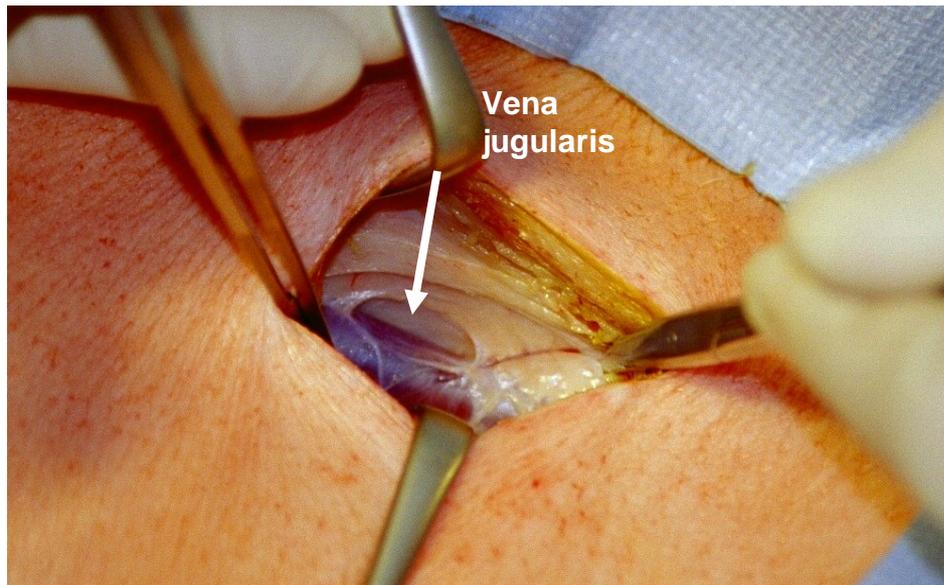


Abbildung 6: Freipräparierte Vene zwecks späterer Entnahme zur Zellisolation (Tier Nr. 100)

2.5.1.3 Wundversorgung

Die Nachversorgung der Wunde sowie das Ziehen des Nahtmaterials nach einer Woche erfolgten durch das Personal der tierexperimentellen Einrichtung. Während des postoperativen Verlaufs wurde die Wunde täglich inspiziert, alle drei Tage wurden Gewicht und Temperatur gemessen und das Nahrungs- und Aktivitätsverhalten der Tiere beobachtet.

2.5.1.4 Implantation

Die Tiere wurden wie unter 2.1.4 und 2.1.5 beschrieben auf die Operation vorbereitet.

2.5.1.5 Implantationsort

Die Lagerung der Schweine erfolgte wie unter 2.5.1.2 beschrieben. Die Prothesen wurden jeweils in die Arteria femoralis superficialis unterhalb des Leistenbandes implantiert. Der Bereich im Trigonum femorale wurde großflächig rasiert und mit Betaisodona desinfiziert. Der gesamte Körper wurde mit sterilen OP-Tüchern bedeckt. Ein 15x20 cm großes Areal im Bereich des Ligamentums inguinale wurde für die Operation ausgespart. Ein 10-12cm längsverlaufender Schnitt wurde mittig vom Leistenband aus als Zugang gesetzt. Nach Präparation der Faszien konnte, unter besonderer Schonung des Nervus femoralis, ein 7 cm langes Segment der Arteria femoralis superficialis unterhalb der Bi-

furkation der Arteria femoralis communicans freipräpariert werden. Das Abklemmen eines ca. 7 cm langen Arteriensegments erfolgte erst proximal dann distal, um schließlich ein ca. 6 cm langes Arterienstück zwischen den Klemmen herauszutrennen. Eine Heparin-haltige Kochsalzlösung (2500 IE/250 ml) wurde kurz vor dem Abklemmen i.v. appliziert. Die beschichtete Kollagenmatrix-Gefäßprothese wurde dem Transportbehälter entnommen und in einen Kochsalzlösung enthaltenden sterilen Behälter überführt. Die ePTFE-Prothese und die unbeschichtete Kollagenmatrix-Gefäßprothese konnten direkt der sterilen Verpackung entnommen werden. Die Prothesen wurden auf die gewünschte Länge zugeschnitten und die Prothesenenden in End-zu-End Technik implantiert. Verwendet wurde ein fortlaufender Faden (Prolene 6/0). Begonnen wurde stets an einem dorsal gelegenen Anfangspunkt. Die distale Klemme wurde vor der letzten Verknotung gelöst, die Prothese entlüftet und schließlich die proximale Klemme gelöst. Nach Spülung der Wundhöhle und der Koagulation der Blutungen im Wundgebiet, erfolgte die Überprüfung der implantierten Prothese auf Defekte. Der Blutfluss wurde zuerst digital und dann visuell anhand der Pulsationen kontrolliert. Nach ausführlicher intraoperativer Blutstillung erfolgte der schichtgerechte Wundverschluss mit anschließendem Verband.

2.5.1.6 Wundnachsorge

Alle drei Tage wurden Gewicht und Temperatur und das Aktivitäts- und Nahrungsverhalten kontrolliert. Die zeitgerechte Entfernung des Nahtmaterials erfolgte bei trockenen und reizlosen Wundverhältnissen am 14. postoperativen Tag durch das Personal der tierexperimentellen Einrichtung. Bei allen Tieren fand die Messung des Blutflusses mittels Duplexsonographie 14 Tage und 28 Tage nach der Prothesenimplantation statt.

2.5.1.7 Ultraschall-Dopplermessungen

Die Durchflussmessungen wurden ca. 14 sowie 28 Tage nach der Implantation mittels des Gerätes Sonotron Vingmed CFM-800 (Abb.7) ermittelt. Dieses Gerät ist Teil der apparativen Ausstattung der tierexperimentellen Einrichtung der Charité Campus Virchow.



Abbildung 7: Sonotron Vingmed CFM-800 (Bild oben) und Sektorschallkopf (Bild unten)

Es wurde ein Sektorschallkopf mit einer Sendefrequenz von 7,5 MHz verwendet. Der Schallwinkel lag bei 45°.

2.5.2 Prothesenexplantation

Nach ca. 6 Wochen erfolgte die Explantation der Prothesen. Die Anästhesie und Lagerung der Tiere erfolgten wie unter 2.1.4, 2.1.5 sowie unter 2.5.1.2 beschrieben.

2.5.2.1 Zugang und chirurgische Technik

Die bestehende Narbe diente als Orientierung für den ersten Schnitt. Nach Präparation der Faszien wurde das Implantat von umgebendem Gewebe freigelegt. Jede Prothese wurde vor der Entnahme digital auf seine Offenheit geprüft. Nach dem Abbinden der Abschnitte des nativen Gefäßes 1 cm proximal und distal des Implantats, gelang die Explantation der Prothese mit 2 cm anhängender nativer Arterie und die Überführung in ein Falconröhrchen mit 1%-iger Formalinlösung. Die Prothesen wurden zur Untersuchung direkt in das histologische Labor transportiert.

2.5.2.2 Verbleib des Versuchstiers

Den Tieren wurde hochkonzentriertes KCL injiziert. Gemäß den Tierschutzrichtlinien erfolgte die Entsorgung der Körper nach Eintritt des Todes in der Tierkörperbeseitigungsanstalt (TBA).

2.6 Histologische und immunhistologische Untersuchung

2.6.1 Immunhistologische Untersuchungen der Explantate

Die zu beschreibenden histologischen und immunhistologischen Untersuchungen wurden in der AG Infektions-/Entzündungspathologie/Orthopädische Pathologie des Pathologischen Instituts der Charité Universitätsmedizin Berlin nach den dort geltenden Standardarbeitsanweisungen durchgeführt. Zur Absicherung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurden positive und negative Kontrollen bei den Untersuchungen vorgenommen. Von den zu implantierenden Gefäßprothesen wurden Querschnitte angefertigt. Die Explantate wurden hingegen an deren Längsschnitten untersucht, um einen Gesamteindruck von den Prozessen zu erlangen, die sich innerhalb der 6 Implantationswochen an den Prothesen entwickelt haben. Die Schnitte liefern ein Gesamtbild des zentralen und Anastomosenbereiches der Gefäßprothese.

2.6.1.1 HE-Übersichtsfärbungen

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist die Standardfärbung in der Histologie, die einen Überblick über die Struktur des Gewebes liefert und dabei die Unterscheidung der untersuchten Strukturen in normal, entzündlich oder degenerativ verändert oder pathologisch ermöglicht. Hämalun ist positiv geladen und bindet sich an die sauren Bestandteile der

DNS und führt hierdurch zur Kernfärbung. Eosin ist hingegen negativ geladen und bindet sich an die positiven Gewebsbestandteile (Eiweiße) und dient somit der Zytoplasmafärbung.

2.6.1.2 Zelltypennachweis

Der Zelltypnachweis der Endothelzellen erfolgte mittels des polyklonalen Antikörpers gegen den von-Willebrand-Faktor, einem ausschließlich von Endothelzellen exprimierten Blutgerinnungsfaktors. Die Untersuchungen wurden mit dem „Polyclonal Rabbit Anti-Human Von-Willebrand-Factor“, Artikel-Nr. A008202 der Firma DakoCytomation durchgeführt, da dieser über eine gute Kreuzreaktivität mit porcinen Endothelzellen verfügt. Mittels des Färbesystems LSAB+ System-HRP von DakoCytomation wurde der Antikörper sichtbar gemacht und nahm die charakteristische Braunfärbung an.

2.6.1.3 Kollagen-Typ Nachweis (III und V)

Für den Nachweis der Kollagentypen III und V wurden folgende Antikörper verwendet:

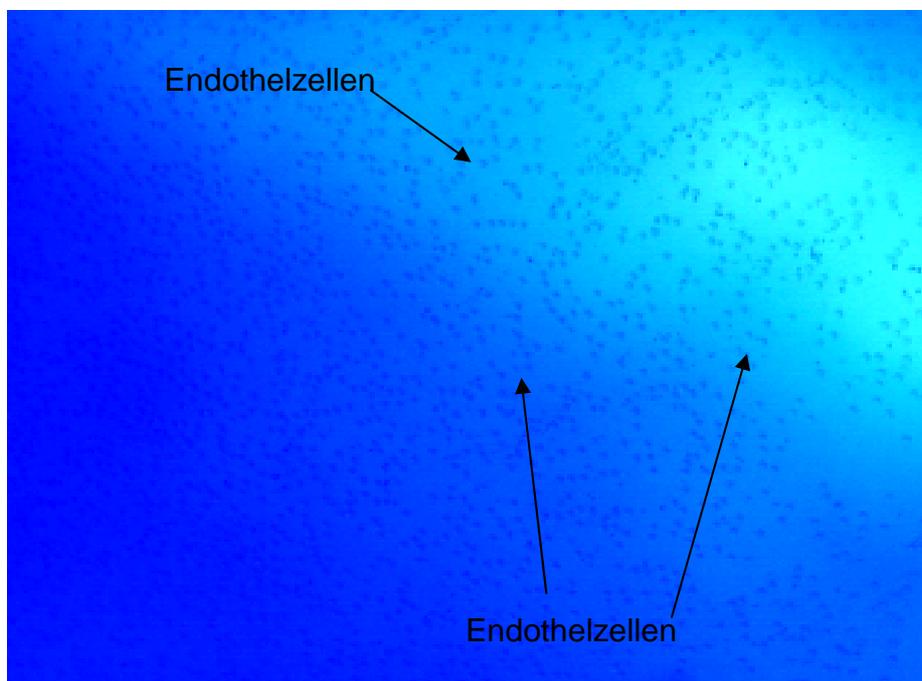
- Collagen III-Antikörper, Mouse IgG, Artikel-Nr. MU167-UC, DCS Innovative DiagnostikSysteme
- Collagen V-Antikörper, Rabbit

In den Kontrollen an menschlichem Hautgewebe wurde die Spezifität der Antikörper gegen die genannten Kollagentypen nachgewiesen. Immunfärbungen der Explantate mit den genannten Antikörpern blieben negativ und werden daher im Bericht nicht exemplarisch in Bildform dargestellt. Zusätzlich wurden Übersichtsfärbungen mittels der Elastica-van-Giesson-Methode durchgeführt, um den Verbleib des Kollagens, aus denen die Kollagengefäßprothesen aufgebaut sind und das Vorhandensein von Elastinfasern in den Explantaten zu prüfen.

3 Ergebnisse

3.1 In-vitro Vorversuche

Auf den drei untersuchten Prothesen wurde eine konfluente Endothelzellschicht beobachtet, die keine toten Endothelzellen aufwies. Abbildung 8 stellt die gleichmäßige konfluente Endothelschicht der Prothese Nr.3 dar. Aufgrund der Durchlichtmikroskopie und der Porosität des Materials kommt es zu den Hell-Dunkel-Unterschieden. Die Durchführbarkeit des Beschichtungsverfahrens der Kollagenmatrixprothesen mit Endothelzellen konnte somit für die nachfolgenden Versuche bestätigt werden.



Prothese 3

(Übersichtsbild (16 x); Färbung: trypanblau)

Abbildung 8: Übersichtsbilder zur Beurteilung der Konfluenz der Gefäßprothesen

3.2 Tierversuch

Die Tierhaltung, die Operationen sowie die Nachbehandlungen und -untersuchungen wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité-Universitätsmedizin Berlin am Standort Virchow-Klinikum durchgeführt und von den dortigen Mitarbeitern unterstützt. Durch die Nutzung von drei Ersatztieren konnte der Ausfall von 2 Tieren kompensiert werden. Das Tier Nr.36 erkrankte unmittelbar nach der Venenextraktion an den Folgen

einer OP-unabhängigen Abszessbildung und musste eingeschläfert werden. Ein weiteres Tier (Nr.97) starb, da dessen Prothese offensichtlich unmittelbar nach Implantation an den Anastomosen okkludierte. Tabelle 2 veranschaulicht den versuchstierbezogenen und zeitlichen Ablauf des Versuchs und gibt Anmerkungen zu Zwischenergebnissen bzw. Vorkommnissen wieder.

Tier-Nr.	VTT-Nr.	Explantation der Vene	Implantation der Prothese	Implantattyp	US-Messung	Explantation	Besonderheiten
<u>Kontrolltiere</u>							
10	k.A.	entfällt	26.10.04	ePTFE	26.11.04. ; 14.12.04	08.12.04	Kontrolltier (unbeschichtete ePTFE-Prothese)
35	002T280904	27.09.04	13.10.04	Kollagen	29.10. 04Stenose; 18.11.04	24.11.04	Kontaminierte Zellkultur als Kontrolltier weiterverwendet (unbeschichtete Kollagenmatrixgefäßprothese)
<u>Therapiegruppe</u>							
38	003T280904	28.09.04	13.10.04	EC+Fib	29.10.04; 18.11. 04	24.11.04	
37	005T280904	28.09.04	13.10.04	EC+Fib	29.10.04; 18.11.04.	24.11.04	
99	012T261004	26.10.04	11.11.04	EC+Fib	26.11.04.; 14.12.04 Stenose	22.12.04	
100	013T261004	26.10.04	11.11.04	EC+Fib	26.11.04; 14.12.04.	22.12.04	Kompletter Verschluss, blutleere Prothese, auf dem Oberschenkel gelegen (sonst in Leistenbeuge)!
48 (98)	011T261004	26.10.04	11.11.04	EC+Fib	26.11.04; 14.12.04.	14.02.05	Beobachtungsphase auf 14 Wochen ausgedehnt
<u>Aus der Studie ausgeschlossene Tiere</u>							
97 (93)	009T131004	13.10.04	12.11.04	EC+Fib	Entfällt, da nach Implantation durch Infektion bereits okkludiert	08.12.04	Serombildung am 18.11. geöffnet: serotischer Erguss. Tier wurde eingeschläfert
36	004T280904	28.09.04					OP-unabhängige Abszessbildung à eingeschläfert

EC= Endothelzellen, Fib=Fibroblasten, US=Ultraschall

Tabelle 2: Zeitlicher Ablauf des Versuches

3.2.1 Explantation des Venensegments

Der prä- und postoperative Verlauf gestaltete sich bei 7 Versuchstieren komplikationslos. Bei dem Versuchstier Nr. 35 kam es postoperativ zu einer Abszessbildung im Halsbereich und zu einer starken systemischen Infektion, so dass dieses Tier von der Pilotstudie ausgeschlossen werden musste..

3.2.2 Isolation und Kultivierung der Endothelzellen und Fibroblasten

Die Zellisolation und -propagierung erfolgte gemäß SOP der VasoTissue GmbH und wurde entsprechend protokolliert und fotodokumentiert. Die Isolation und Kultivierung der Endothelzellen und Fibroblasten erfolgten wie unter 2.3 beschrieben. Alle Zellchargen wurden mit dem Cell-Counter CASY[®]1 gezählt und nach Anfärbung auf Vitalität geprüft werden. Bei einer durchschnittlichen PDT von 55,6 Stunden lag das PDL bei durchschnittlich 3,94. Innerhalb von 9 Tagen erreichten die Zellzahlen der Endothelzellen Werte von durchschnittlich $1,76 \times 10^6$ und der Myofibroblasten Werte von durchschnittlich 5×10^5 , die eine Aussaat der Zellen auf den Prothesen ermöglichten, so dass die Fertigstellung der Gefäßprothesen termingemäß zum OP-Termin gesichert war. Die Kulturen wurden regelmäßig auf Kontaminationen untersucht. Beim Versuchstier Nr. 35 wurde eine bakterielle Kontamination der Zellkulturen beobachtet, so dass die anschließende Beschichtung der Prothese entfiel. Das Tier wurde daher als Kontrolltier zur Implantation einer unbeschichteten Kollagenmatrix-Gefäßprothese genutzt.

3.2.3 Beschichtung der Prothesen unter dynamischen Bedingungen

Die Reynoldszahl wurde wie folgt berechnet:

$$Re = w \cdot d \cdot \rho / \eta \quad \{Gl.3\}$$

mit $w = Q / (\pi \cdot r^2)$ = mittlere Strömungsgeschwindigkeit [m/s] {Gl.4}

$$\rho = \text{Dichte [kg/m}^3\text{]}$$

gegeben sind:

d [m]	0,01
$w=Q/\pi r^2$ [m/s]	0,050927
η [mPas]	0,7692

ρ [kg/m³]

1,00293

$$Re = (0,05092 \text{ m/s} * 0,01 \text{ m} * 1,00293 \text{ kg/m}^3) / (0,7692 \text{ mPas}) = 0,66401737$$

Die Strömungsbedingungen lagen weit ab von Turbulenzbildungen, so dass die berechnete Reynoldszahl mit 0,66 unter 2300 lag. Damit bestanden im Kultursystem laminaire Strömungsbedingungen.

3.2.4 Implantation der Gefäßprothese

Die Implantation aller Gefäßprothesen konnte komplikationslos durchgeführt werden. Die Operation dauerte durchschnittlich 120 Minuten. Die Prothesenlänge betrug ca.5 cm und der Durchmesser lag bei 6 mm.

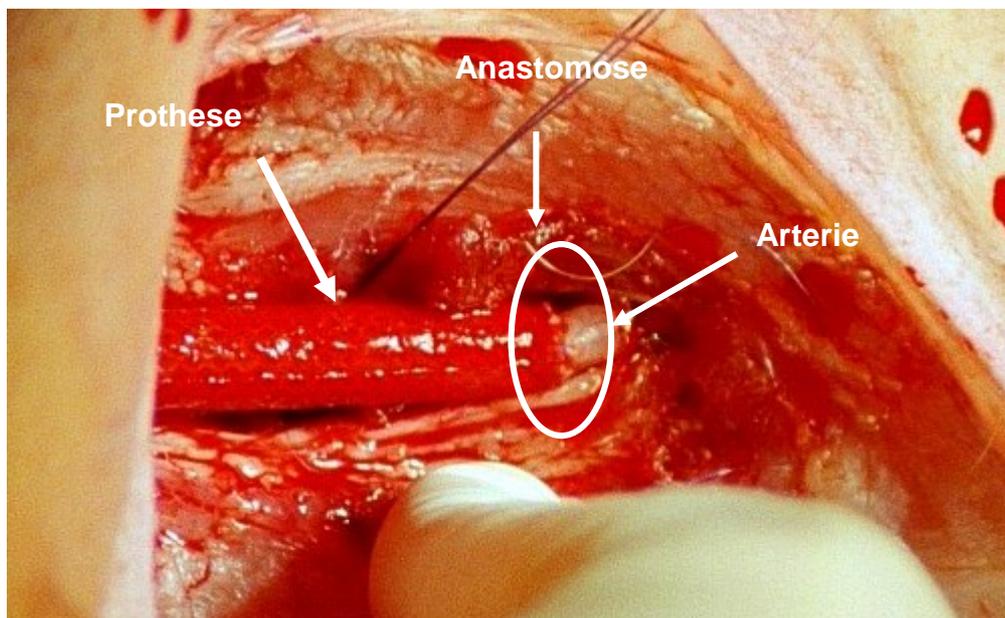


Abbildung 9: Implantierte Prothese

Wie in Abb. 9 deutlich wird, weisen die Arterien grundsätzlich kleinere Durchmesser als die der Prothesen auf (3 vs. 6 mm). Um die Anastomose anlegen zu können, wurde die Arterie, wie in Abb. 10a ersichtlich, durch Aufträufeln von Lidokain dilatiert. Im dilatierten Zustand war das Anlegen einer symmetrischen Naht bedingt möglich. Aus hämodynamischer Sicht birgt ein derartiger Übergang (Abb. 9 und 10b) das Risiko einer frühzeitigen Okklusion in sich. Im Anastomosenbereich können nämlich Turbulenzen auftreten, die ggf. zur Thrombenbildung führen. Durch die Größenunterschiede zwischen Arterie und Prothese kommt es zu einem Compliance-Mismatch, welches ein

entscheidendes Problem bei der Implantation kleinkalibriger beschichteter und unbeschichteter Gefäßprothesen darstellt.

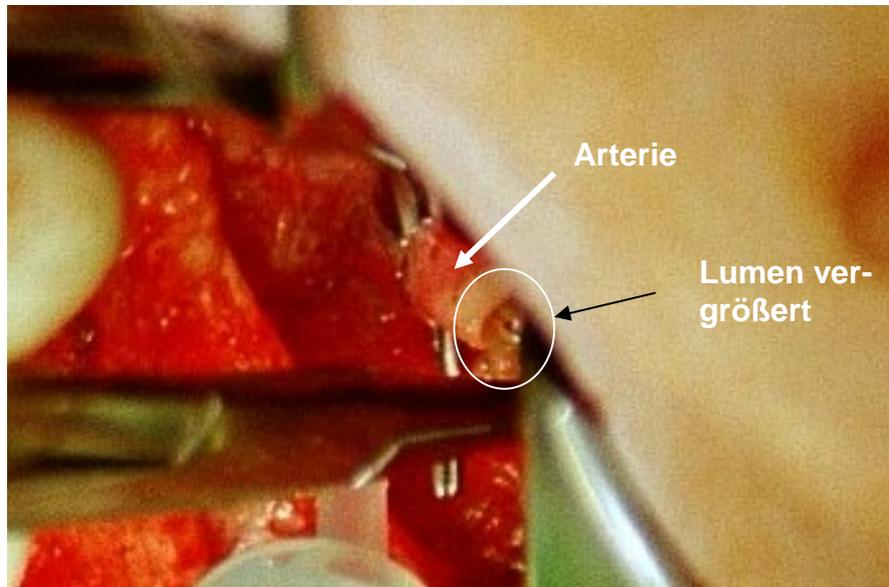


Abb. 10a Dilatation der Arterie (Nr.48)

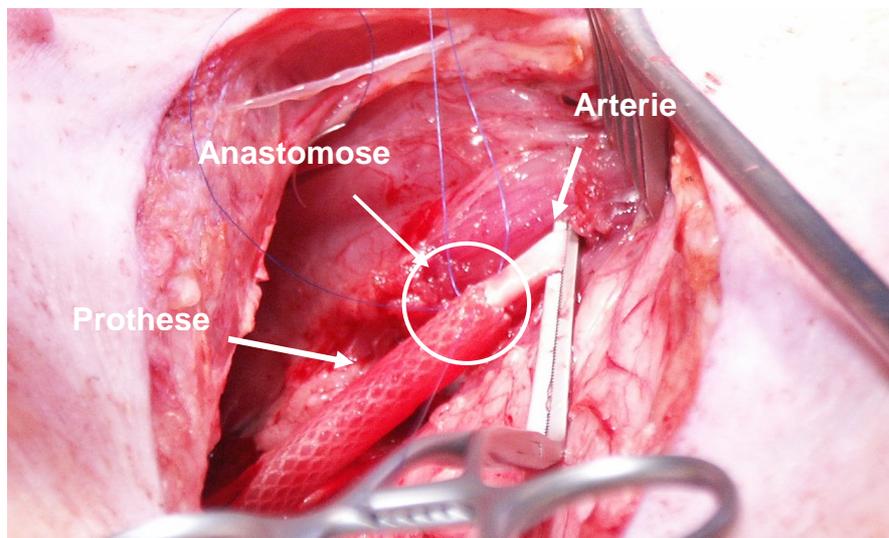


Abb. 10b Strömungskritischer Übergang (Nr. 48)

Abbildung 10 a+b: Dilatation der Arterie

Der postoperative Verlauf gestaltete sich bei 6 von 7 Versuchstieren komplikationslos. Das Versuchstier Nr. 97 wurde aus der Studie ausgeschlossen, da die Prothese am 2. postoperativen Tag aufgrund einer lokalen Infektion im Prothesenbereich bereits okkludiert war.

3.2.5 Ultraschall-Dopplermessungen

Zwei bzw. vier Wochen nach der Operation folgten die Untersuchungen zur Beurteilung der Offenheit. Die Versuchstiere wurden zuvor sediert, um eine sichere Untersuchung zu garantieren.

Wie in dem Diagramm 1 bereits dargestellt, wurden sonografisch keine Verschlüsse festgestellt. Bei dem Tier Nr.99 wurden 4 Wochen nach OP Dopplerkurven (Abb. 11d) registriert, die eine Stenose der Prothese vermuten ließen. Abb. 11d zeigt das typische monophasische Flussprofil einer Stenose.

Tier-Nr.	14 Tage nach OP	28 Tage nach OP
10 (PTFE)	40 cm/s	40 cm/s
35 (Kollagen)	30 cm/s	90 cm/s
37	70 cm/s	60 cm/s
38	60 cm/s	90 cm/s
48	50 cm/s	70 cm/s
99	50 cm/s	40 cm/s
100	50 cm/s	50 cm/s

k.A.: Keine Angabe

Tabelle 3: Durchflussraten 14 und 28 Tage nach der Operation

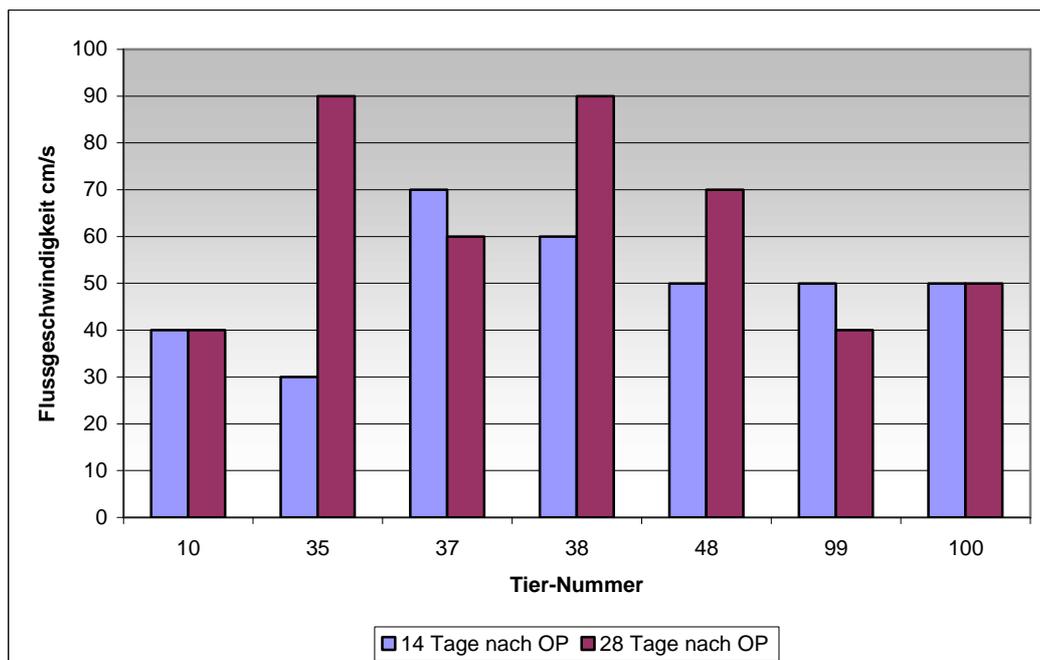


Diagramm 1: Durchflussraten 14 Tage und 28 Tage nach der Operation



Abb. 11a

Tier Nr. 48 am 14. postoperativen Tag

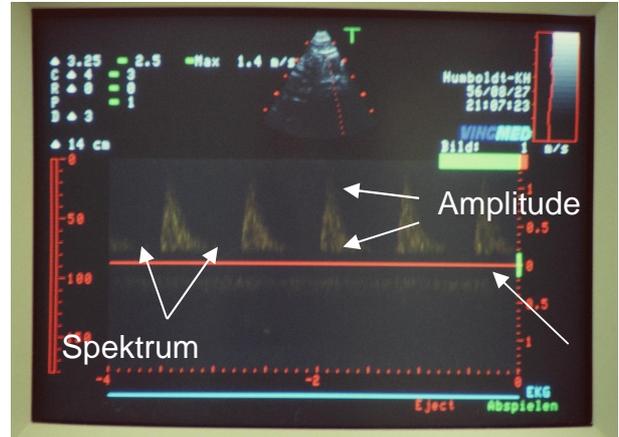


Abb. 11b

Tier Nr. 48 am 28. postoperativen Tag
Das Signalspektrum (li.) der Pulskurve ist schmal
und die Amplitude (re.) erhöht



Abb. 11c

Tier Nr. 99 am 14. postoperativen Tag

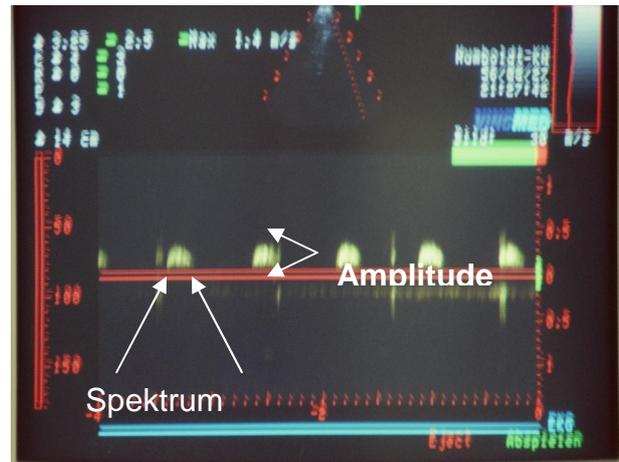


Abb. 11d

Tier Nr. 99 am 28. postoperativen Tag
Das Signalspektrum (l.) der Pulskurve ist verbrei-
tert und die Amplitude (re.) verringert

Abbildung 11 a-d: Ultraschall Dopplermessung



Abb. 12 demonstriert einen biphasischen Verlauf der Flusskurve mit einem systolischem Maximum über und einem enddiastolischem Maximum unter der Nulllinie

Abbildung 12: Tier Nr. 48; Ultraschallmessung am 28.postoperativen Tag

In der Literatur angegebene Flussraten einer gesunden A. femoralis beim Schwein liegen bei ca. 58 cm/s. Wie aus dem Diagramm 1 entnommen werden kann, waren bei den Tieren Nr. 37, 38, 48 und 100 im Vergleich zur Literatur akzeptable Flussraten gemessen worden.

Abb. 12 demonstriert, wie auch in der Literatur angegeben, ein normales Flussprofil der A. femoralis des Schweins mit einem biphasischen Verlauf der Flusskurve, der sich aus einem systolischem und einem enddiastolischem Maximum ergibt. Dabei kommt es zu einer frühdiastolischen Unterschreitung der Nulllinie und einem enddiastolischen Maximum der Flusskurve unterhalb der Nulllinie. Die Pulscurven spiegelten jedoch nur im Fall des Versuchstiers Nr. 99 eine deutliche Stenose der Prothese wieder. Dabei zeigt Abb. 11d im Vergleich zu Abb.12 ein monophasisches Flussprofil mit reduzierter Strömungsgeschwindigkeit. Dabei kommt es nicht zu einer frühdiastolischen Unterschreitung der Nulllinie.

Zudem ist auf Abb. 11d ersichtlich, dass im Vergleich zu Abb. 11b das Spektrum der Flusskurven verbreitert und die Amplituden verringert sind. Sowohl der monophasische

Verlauf als auch die Amplitudenverringering und die Spektrumverbreiterung der Flusskurven in Abb. 11d sind daher eindeutige Hinweise auf eine Stenose.

3.2.6 Explantation der Gefäßprothese

Nach Durchtrennen der Hautschichten, musste der Bereich der Leistenbeuge gründlich inspiziert werden, da - wie sich bei allen Kollagenmatrix-Gefäßprothesen zeigte - nur eine äußerst milde Reaktion auf das die Prothese umgebende Kunststoffmaterial stattgefunden hatte und somit die Lage der Prothese schwer auszumachen war (Abb. 13a). Erschwerend kam hinzu, dass die Prothesen bei Jungtieren implantiert worden waren, deren Wachstum noch nicht abgeschlossen war. So konnte es während der Verweildauer der Prothese im Organismus zu einer Positionsverschiebung derselben kommen. Im Gegensatz dazu war die ePTFE-Prothese durch schwartenartiges Narbengewebe inkapsuliert (Abb. 13b).

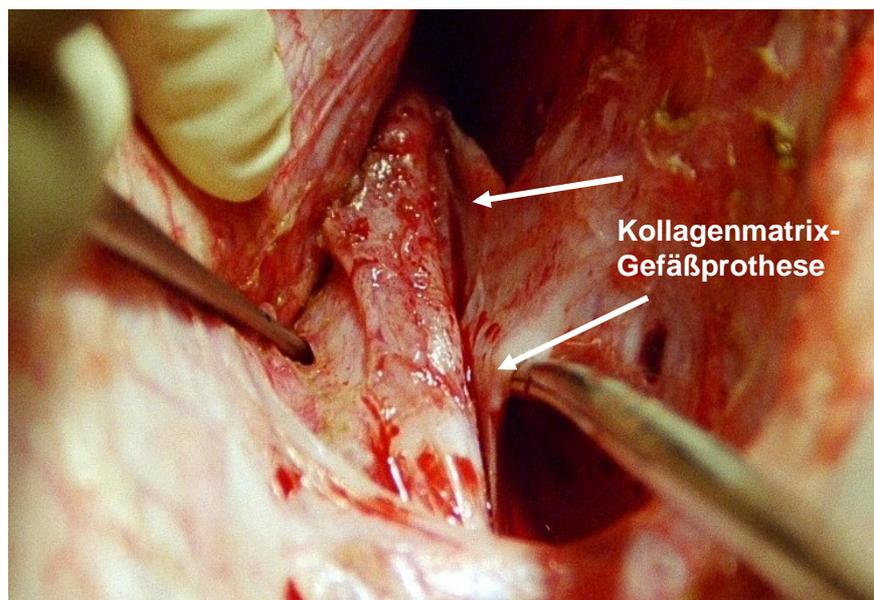


Abb. 13a Kollagenmatrix-Gefäßprothese *in situ* (Nr. 37)

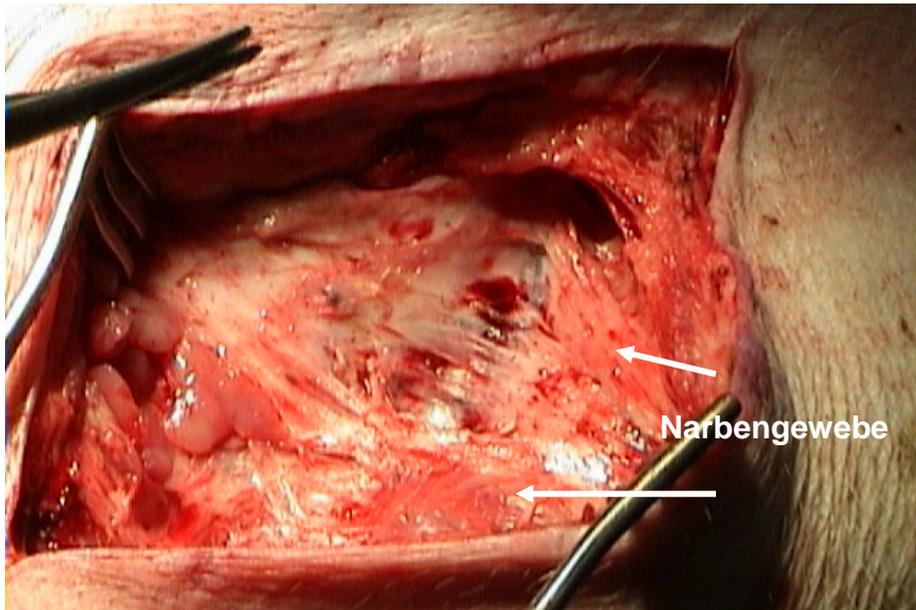


Abb. 13b Narbgewebe um die ePTFE-Prothese

Abbildung 13 a+b: Explantation der Gefäßprothese

Im Gegensatz zu der ausgeprägten Narbenbildung um die ePTFE-Prothese (Abb. 13b) ist das die Kollagenmatrixprothese umgebende Narbgewebe (Abb. 13a) geringfügig und wird an den folgenden Bildern eines Explantats deutlich.



Abb. 14a Distale Anastomose des Explantats
(Nr.100)



Abb. 14b Proximale Anastomose des
Explantats (Nr. 100)

Abbildung 14: Explantat der Kollagenmarix-Gefäßprothese

Bei der Explantation der Prothesen fiel allgemein auf, dass diese keine runden Proportionen aufwiesen, sondern stark abgeflacht waren (Abb. 14 a +b) Es wird vermutet, dass die Prothesen wachstumsbedingt zunehmend unter Spannung geraten und gegen die Muskulatur gepresst werden, was zu einer Abflachung und geometrischen Stenose-

rung der Prothesen führen kann. Die geometrische Ursache für eine Stenosierung der Prothesen ergibt sich aus den zwar normalen, jedoch abgeflachten Pulscurven der sonografischen Untersuchungen. Das Wachstum, die Gewichtszunahme und die Vitalität der in der Untersuchungsreihe eingeschlossenen Tiere können als normal eingeschätzt werden. Es wurde insbesondere kein retardiertes Wachstum der Hinterläufe beobachtet, deren arterielles Hauptgefäß segmental durch eine Prothese ersetzt worden war. Makroskopisch wurde bei keiner Explantation eine Kollateralenbildung im Umfeld der Prothese beobachtet.

3.2.7 Histologische und immunhistologische Untersuchungen

3.2.7.1 HE-Übersichtsfärbungen

Alle Explantate weisen kein durchgehend offenes Lumen mehr auf. Abb. 15, 16 sowie 17a/b zeigen Hinweise auf folliculäre entzündliche Infiltrate im Anastomosenbereich. Histopathologisch wurden sequentiell weitere Abschnitte der explantierten Prothesen untersucht. Hierbei zeigte sich ein identisches Bild einer Entzündungsreaktion. Diese Abbildungen sind hier nicht dargestellt.



Abbildung 15 Histologisches Bild (HE-Färbung)

Übersichtsbild (16 x) des Anastomosenbereiches des Explantats

Nr. 99 der Prüfgruppe (6. Woche)

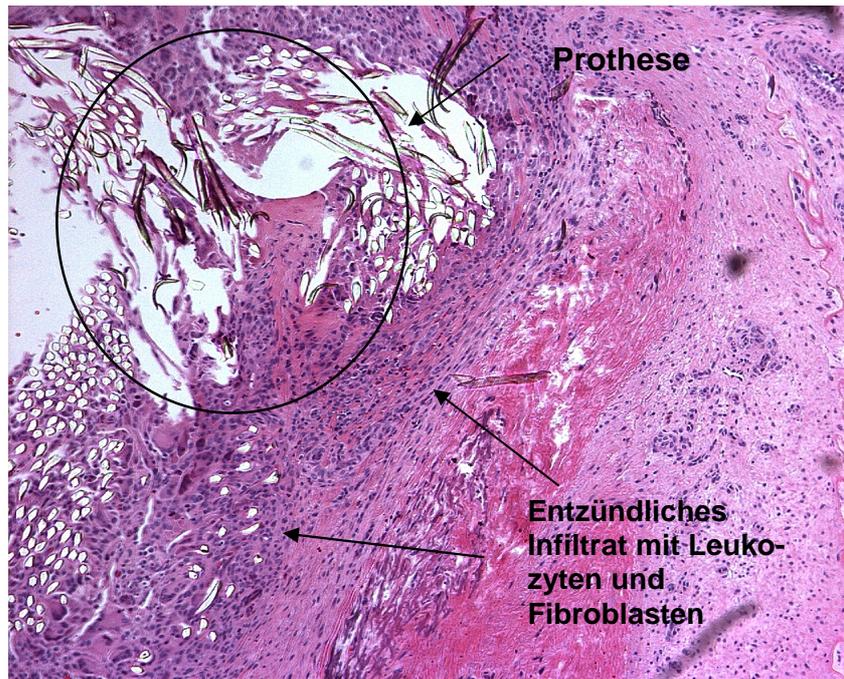


Abbildung 16 Histologisches Bild (HE-Färbung)

Detailansicht (100x) des folliculären entzündlichen Infiltrats (blau gefärbte Areale) in der explantierten Kollagenmatrix-Gefäßprothese Nr. 99

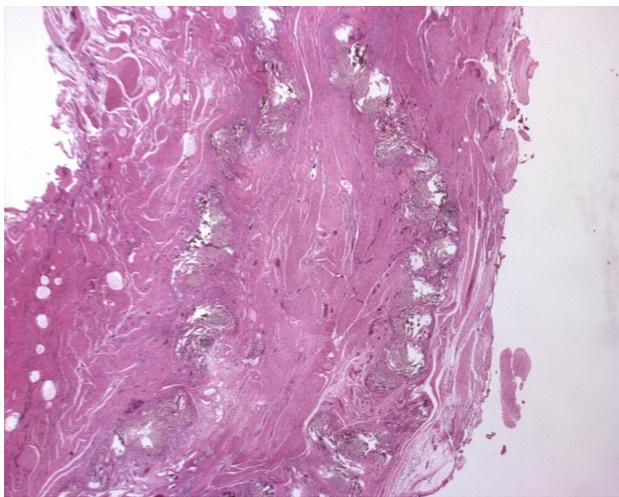


Abb. 17a

Übersichtsbild (16x) des Anastomosenbereiches des Explantats von Tier Nr. 48 der Prüfgruppe (14 Wo.)

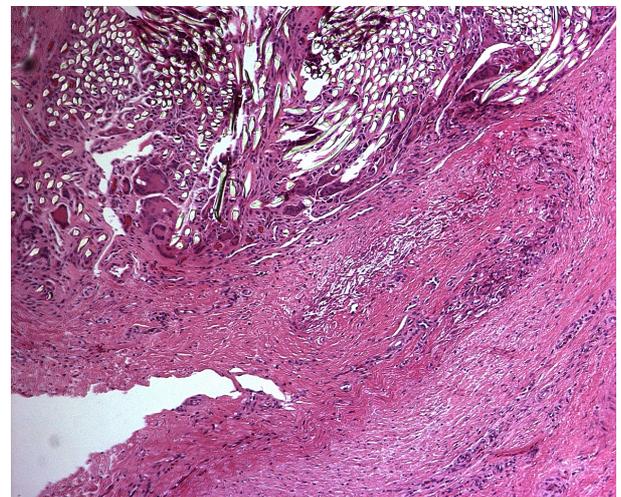


Abb. 17b

Detailansicht (100x) des Anastomosenbereiches in der explantierten Gefäßprothese von Tier Nr. 48

Abbildung 17: Histologische Bilder(HE-Färbung)

Diese generell follikulären, entzündlichen mononukleären Infiltrate (blau gefärbte Areale Abb. 15, 16 und 17 a/b) sind als eindeutige Hinweise für eine Abstoßungsreaktion auf das bovine Kollagen zu werten. Die Infiltrationen weisen zudem einen hohen Zellanteil, u.a. aus Fibroblasten und Leukozyten bestehend, auf, die auch einen Hinweis auf eine immunologische Reaktion des Empfängerorganismus auf den Fremdkörper geben. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Umstand, dass keine Thromben in den Lumen der Gefäßprothesen vorzufinden waren. Lediglich im Explantat des Versuchstiers mit der Nr.97 (Abb. 20) wurde eine Thrombosierung festgestellt.

Für diese Vermutung spricht auch, dass am Explantat des Versuchstiers Nr. 48, das sich über 14 Wochen als Bypass im Organismus befand, eine Umwandlung des entzündlichen Infiltrats in Bindegewebe zu beobachten ist (Abb. 17b).

Anhand des die Gefäßprothese umhüllenden und stabilisierenden Geflechts aus Kunststofffasern wird deutlich, dass die Prothesen nicht gerade, sondern vielmehr abgeflacht verlaufen und an vielen Stellen Verengungen aufweisen.

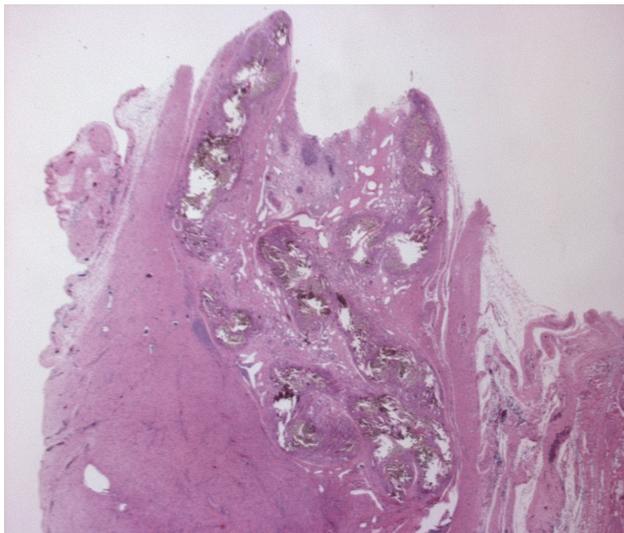


Abb. 18a

Übersichtsbild (16x) des Anastomosenbereiches des Explantats von Tier Nr. 35 der Kontrollgruppe (unbeschichtete Kollagenmatrix-Gefäßprothese) (6 Wo.)

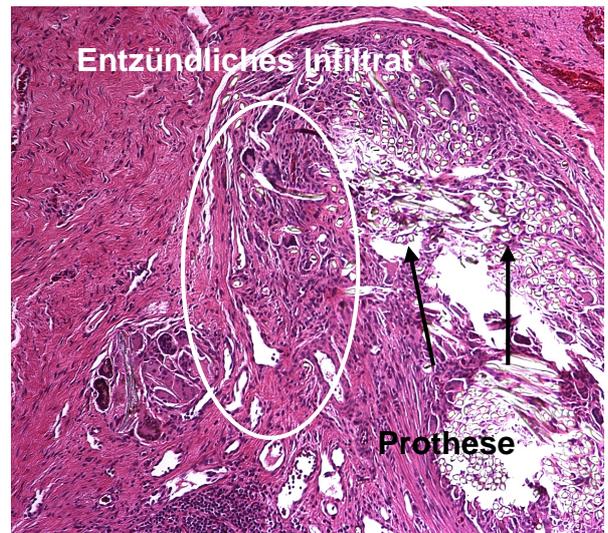


Abb. 18b

Detailansicht (50x) des follikulären entzündlichen Infiltrats in der explantierten unbeschichteten Kollagenmatrix-Gefäßprothese von Tier Nr.

35



Abb. 18c

Übersichtsbild (16x) des Anastomosenbereiches des Explantats von Tier Nr. 10 der Kontrollgruppe (ePTFE-Prothese) (6.Woche)

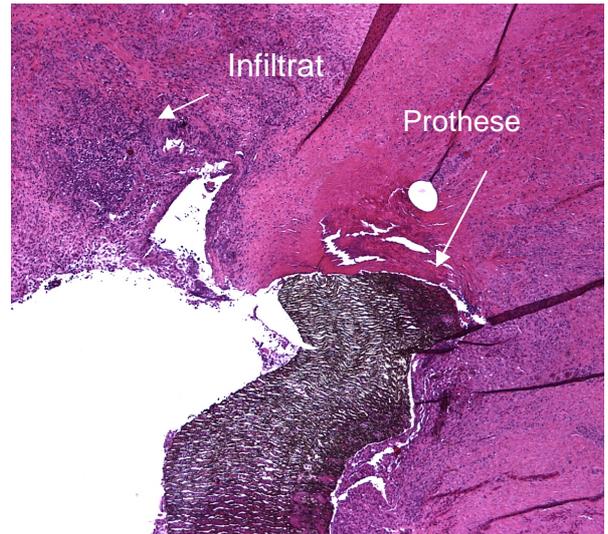


Abb. 18d

Detailansicht (50x) des diffusen entzündlichen Infiltrats in der explantierten ePTFE-Gefäßprothese des Tieres Nr. 10

Abbildung 18a-d: Histologische Bilder (HE-Färbung)

Wie aus den Abbildungen 18 a-d deutlich wird, wiesen die Kontrollen (unbeschichtete Kollagenmatrix-Gefäßprothese (Tier Nr. 35); unbeschichtete ePTFE-Prothese (Tier Nr. 10) Infiltrationen bzw. Granulationsgewebe auf.

Das Explantat der ePTFE-Gefäßprothese zeigte im Gegensatz zu den Kollagenmatrix-Explantaten typischerweise diffuse entzündliche Infiltrationen (Abb. 18d).

Die Infiltrate in den histologischen Untersuchungen der Kollagenmatrix-Gefäßprothesen sind von einer Vielzahl von Hohlräumen und Gangsystemen durchsetzt, die, wie immunhistologische Untersuchungen belegen, mit Endothelzellen ausgekleidet sind.

3.2.7.2 Zelltypnachweis

Bei den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Hohlräumen und Gangsystemen kann nicht generell von Gefäßneubildungen gesprochen werden, da die Wandungen der größeren Hohlräume überwiegend keine gefäßtypischen Strukturen unterhalb der Endothelschicht aufweisen (Abb. 19a-d). Vorrangig die kleinen Hohlräume zeigten teilweise den typischen Schichtenaufbau von Gefäßen. Die in den Ultraschalluntersuchungen

gefundenen Dopplersignale stehen scheinbar im Widerspruch zu den histologischen Befunden.



Abb. 19 a

Endothelzellnachweis (100x) im Explantat von Tier Nr. 99 der Prüfgruppe (6 Wo.). Die Hohlräume sind mit einem Monolayer von Endothelzellen ausgekleidet.

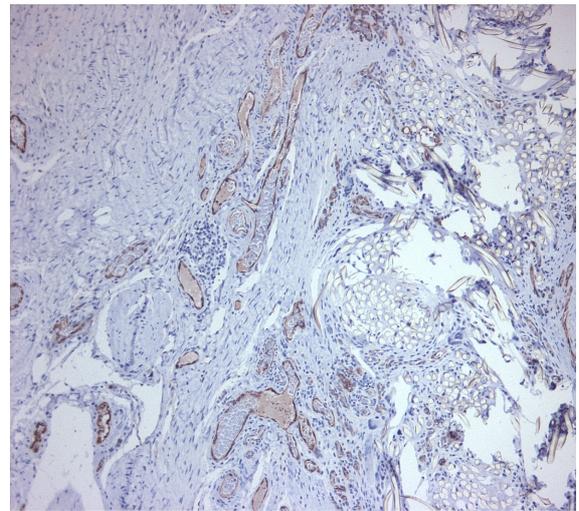


Abb. 19 b

Endothelzellnachweis (100x) im Explantat von Tier Nr. 48 der Prüfgruppe (14 Wo.). Die Hohlräume sind mit einem Monolayer von Endothelzellen ausgekleidet

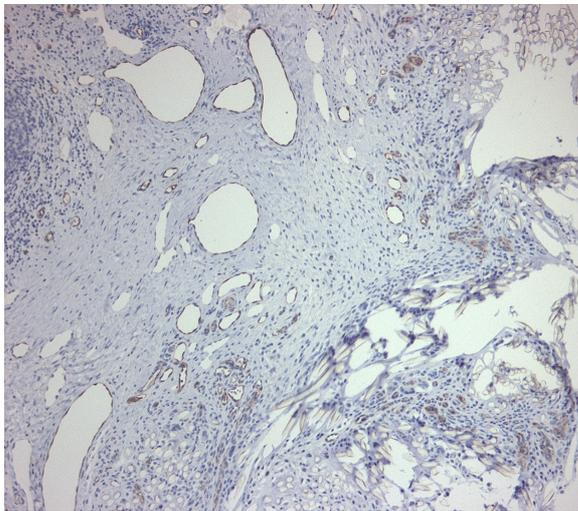


Abb. 19 c

Endothelzellnachweis (100x) im Explantat von Tier Nr. 35 der Kontrollgruppe, unbeschichtetes Kollagenmatrix-Gefäßprothese (6Wo.).

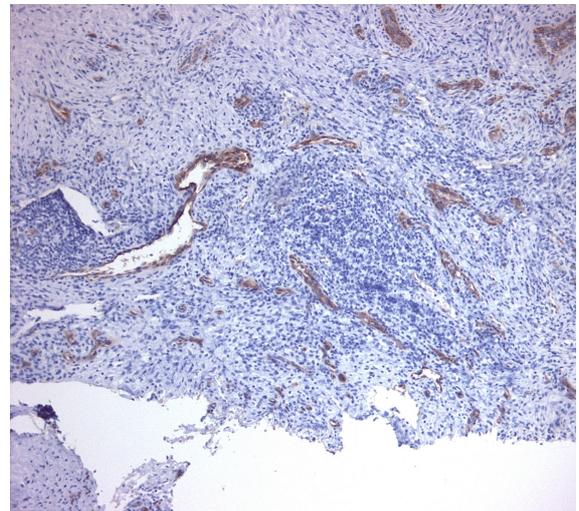


Abb. 19 d

Endothelzellnachweis (100x) im Explantat von Tier Nr. 10 der Kontrollgruppe, unbeschichtete ePTFE-Prothese (6 Wo.).

Abbildung 19 a-d: Zelltypnachweis

3.2.7.3 Konfluenzuntersuchung

Aufgrund der gravierenden strukturellen Veränderungen in den explantierten Gefäßprothesen konnte keine konfluente Endothelzellschicht mehr nachgewiesen werden.

3.2.7.4 Thrombencharakterisierung

Wie im Weiteren oben ausgeführt, sind aufgrund der gravierenden Umbauprozesse in der Gefäßprothese, keine signifikanten Thromben zu beobachten. Von allen Explantaten war nur im Explantat des Versuchstiers Nr.97 ein Thrombus zu detektieren (Abb. 20).

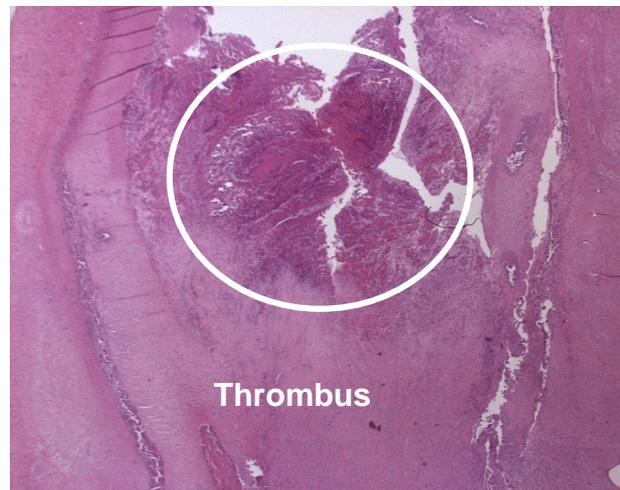


Abbildung 20: HE-Färbung des Längsschnitts des Explantats von Versuchstier Nr. 98 (16x)
Die Thromben stellen sich als rot gefärbtes Areal im oberen Bild Drittel dar.

3.2.7.5 Kollagen Typ-Nachweis (III und V)

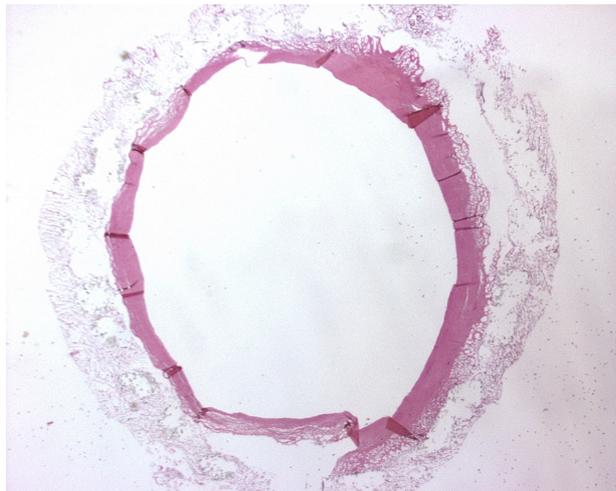


Abbildung 21: Kollagen Typ-Nachweis

Abbildung 21 zeigt die Kollagenfärbung (16x) einer unbeschichteten Kollagenmatrix-Gefäßprothese, die unbeschichtet als Kontrollprobe bzw. zellbeschichtet als Prüfprobe implantiert wurde. Aus den nachstehenden Detailaufnahmen (Abb. 22a-d) wird deutlich, dass sich Kollagenfasern - als dunkelrote Faserstrukturen - nicht jedoch Elastinfasern nachweisen lassen. Wie auf der Abb. 21 deutlich zu erkennen ist, besteht die Prothese aus einer kompakten zelllosen bovinen Kollagenschicht, die in den Explantaten (Abb. 22a-d) nicht mehr nachzuweisen ist. Jedoch kommen in den Explantatschnitten lediglich porcine Kollagenfasern vor, die im Rahmen der Bindegewebsausbildung gebildet wurden und somit keine kompakte Struktur mehr aufweisen.



Abb. 22 a

Kollagenanfärbung (50x) des Explantats von Tier Nr. 10 der Kontrollgruppe, unbeschichtete ePTFE-Prothese (6 Wo.)

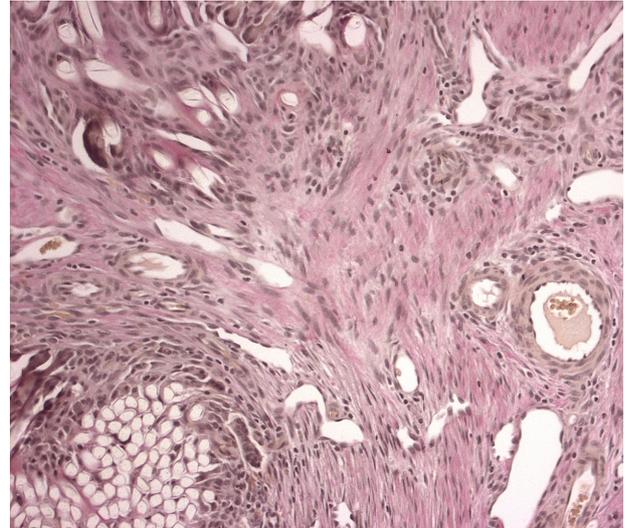


Abb. 22 b

Kollagennachweis (400x) im Explantat von Tier Nr. 35 der Kontrollgruppe, unbeschichtete Kollagenmatrix-Gefäßprothese (6 Wo.)

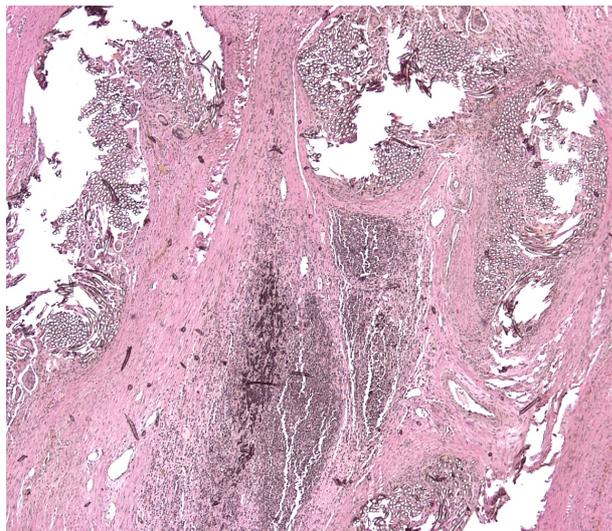


Abb. 22c

Kollagennachweis (50x) im Explantat von Tier Nr. 99 der Prüfgruppe (6 Wo.)

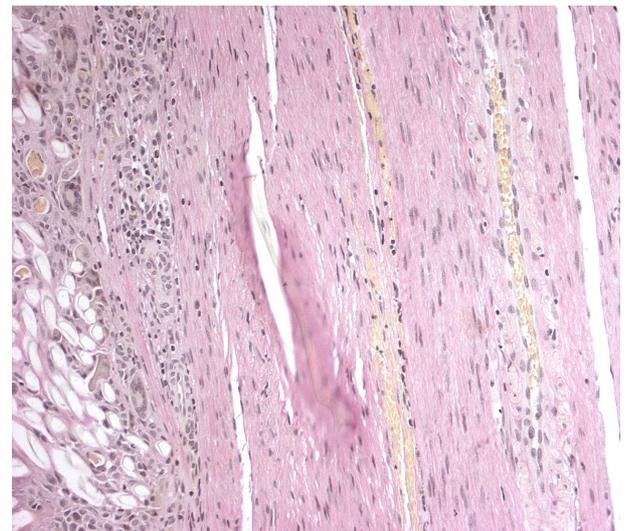


Abb. 22 d

Detailansicht (200x) zum Kollagennachweis im Explantat von Tier Nr.48 der Prüfgruppe(14 Wo.). Es sind keine als amorphe Zentren ausgebildete Elastinfasern nachweisbar.

Abbildung 22a-d: Kollagen Typ-Nachweis

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der Offenheitsraten und der Biokompatibilität von unter Fluss endothelialisierten und mit Myofibroblasten besiedelten Kollagenmatrix-Gefäßprothesen im Schweinmodell. In unserer Studie wurde eine Gefäßprothese aus bovinen Typ1-Kollagen entwickelt. Eine spezielle Proteinschicht kleidet das Lumen aus. In einem Bioreaktorsystem gelang es, Endothelzellen und Myofibroblasten unter dynamischen Bedingungen auf der Protheseinnen- bzw. außenoberfläche zu kultivieren. Diese *tissue engineered* Prothesen wurden in die Arteria femoralis superficialis von Schweinen implantiert, nach 2 und 4 Wochen sonographisch auf ihre Offenheit geprüft und nach 6 Wochen histologisch untersucht. Bisher existieren in der Literatur keine vergleichbaren Studien über die Implantation kleinkalibriger endothelialisierter Kollagenmatrix-Gefäßprothesen im Tiermodell.

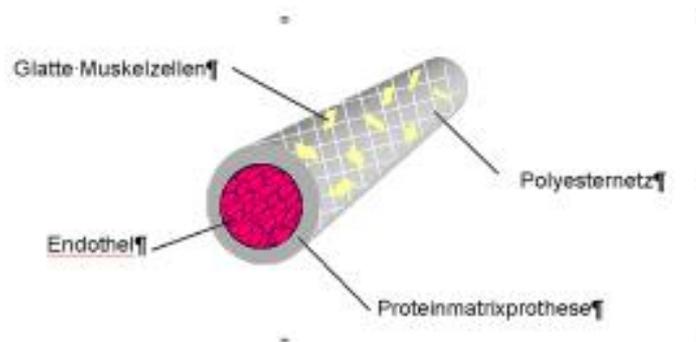
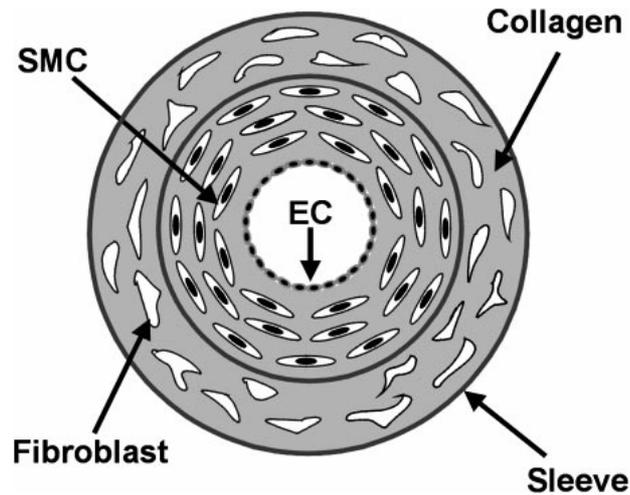


Abbildung 23: Schematische Darstellung der bioartificialen Gefäßprothese. Firma Jotec

Dennoch haben sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Entwicklung von *tissue engineered* Gefäßprothesen auseinandergesetzt. Weinberg und Bell⁷⁰ entwickelten 1986 erstmalig eine Methode, bei der eine mehrschichtige Gefäßprothese aus Kollagen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen (vom Rind) gefertigt werden konnte. Dieses ist eines der ersten „bio-engineerten“ Konstrukte, obgleich diese Konstrukte sich nicht in-vivo bewährten.



Entnommen aus :Seifalian AM, Tiwari A, Hamilton G, et al. Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary grafts: the role of seeding and tissue engineering. *Artif Organs* 2002 Apr;26(4):307-20.

Abbildung 24: Dreidimensionale Gefäßprothese

Lantz et al.⁷¹ entwickelten ein aus der intestinalen Submukosa gewonnenes Gefäßprothesenmaterial. Dieses Material konnte als Auto-, Allo- oder Xenograft genutzt werden und zeigte gute Biokompatibilität und hohe Offenheitsraten von 75% als kleinkalibriger Bypass (4-5mm) der Arteria carotis und der Arteria femoralis des Kaninchens. Huynh und Kollegen⁷² entwickelten eine Prothese aus kollagenem Biomaterial, das aus Anteilen der intestinalen Submukosa und bovinem Typ1-Kollagen stammte. Die innere Oberfläche wurde mit Heparin beschichtet. Diese Gefäßprothese zeigte nach der Implantation in die Aorta von Kaninchen gute Ergebnisse. 1998 wurde diese Methode von L'Heureux wie folgt weiterentwickelt:⁷³ Es wurde ein zusammenhängender Gewebemantel aus glatten Muskelzellen zu einer Gefäßmedia gerollt. Auf diese „Rolle“ aus glatten Muskelzellen konnten anschließend humane Fibroblasten auf die Außenfläche (Adventitia) und humane Endothelzellen auf das Lumen der Gefäßmedia besiedelt werden. Auf diesem Wege konnte diese humane Gefäßprothese intraluminalen Drücken von bis zu 2000 mmHg standhalten. Niklason und Kollegen^{74 75} nutzten Polyglycolicacid (PGA) als Gerüst, um daraus Prothesen zu formen. Diese besiedelten sie anschließend mit Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen und setzten sie danach pulsatilem Flüssen in einem eigens entwickelten Bioreaktorsystem aus. Nach der Implantation im Schwein lag die Offenheitsrate nach 4 Wochen bei 100%. Dieses Experiment veranschaulichte, dass Prothesen unter adäquaten in-vitro Konditionen gute biomechanische Eigenschaften aufweisen. Klinische Anwendung fanden bereits endothelialisierte ePTFE-Prothesen als periphere und Koronar-Bypässe.^{9 76} In einer Studie von Laube et al.

zeigten diese Prothesen gute funktionelle Ergebnisse und zeichneten sich durch eine Neointima aus glatten Muskelzellen und einer einschichtigen Endothelzellschicht aus.²⁶

Die in unserem Versuchsaufbau verwendete Prothese besteht hauptsächlich aus reinem Typ1-Rinderkollagen. Das Kollagen besitzt gute mechanische Eigenschaften und stellt als Matrixprotein ein stabiles Gerüst für die Aussaat von Endothelzellen dar.⁷⁷ Die hohe Porosität und Struktur des Kollagens erlauben ein adäquates Strukturgerüst für die Zellaussaat und ermöglichen die Diffusion von Nährstoffen während der Kultivierung. Des Weiteren kann die Kollagenmatrix-Gefäßprothese kontrolliert biologisch abgebaut werden. Kollagen ist ein nativer Bestandteil von endothelialen Zellmatrices, das als Adhäsionsprotein die Zellanhaftung und Proliferation der Zellen ermöglicht.⁶⁷ Diese wird, durch spezifische Interaktionen zwischen der Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) in Kollagenmolekülen und Integrinen in der Zellmembran begünstigt.⁷⁸ Ihr spezifisches Bindungsvermögen resultiert aus einem fokalen Kontakt der Zellen zum Substrat, das wiederum die Zellanhaftung und die Zellbewegung begünstigt.⁷⁹

Turner et al.⁸⁰ zeigten, dass Typ II- und IV-Kollagen die Endothelzellanhaftung durch Interaktionen mit Integrin $\alpha_1\beta_2$ der EC-Oberfläche und der RGD Sequenz des Kollagens signifikant verbesserten. Es ist beschrieben, dass Typ1-Kollagen eine schnellere endotheliale Haftung an Membranen bewirkt und das Wachstum von EC begünstigt.⁶⁸ ⁸¹Pratt et al.⁸² demonstrierten, dass interstitielles Typ I- und III-Kollagen eine schnellere und gleichmäßigere Konfluenz der Zellen als das Fibronectin bewirkte. Humane venöse endotheliale Zellen (HUVEC), die auf Kollagen kultiviert wurden, konnten nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten einem Scherstress von 9 Pa widerstehen.

Feugier et al.⁸³ zeigten in einer Studienreihe mit endothelialisierten und kollagenbeschichteten Gefäßprothesen, dass Kollagen die Qualität der Zellanhaftung stark verbesserte. Fujiwara et al.⁸⁴ beschichteten Stent-Prothesen mit Typ1-Kollagen und implantierten sie für 12 Wochen in die Arteria femoralis des Kaninchens. Alle kollagenbeschichteten Stents wiesen eine gute Hämokompatibilität und Biokompatibilität auf. Cloft und Kollegen⁶⁸ entwickelten aus bovinen Typ1-Kollagen bestehende Stent-Prothesen und implantierten sie über einen Zeitraum von 12 Wochen in die Aorta abdominalis des Kaninchens. Alle Stents wiesen eine gute Biokompatibilität auf. Histologisch bestanden keine morphologischen Korrelate einer inflammatorischen Reaktion oder Stenosierung

der Stent-Prothese. Außerdem konnte einen Monat nach der Implantation histologisch eine komplette Endothelzellschicht nachgewiesen werden.

Für das Tiermodell wählten wir Schweine als Versuchstiere, da die Anatomie des Gefäßsystems und die Kreislaufphysiologie der Schweine der des Menschen vergleichbar sind.⁸⁵ Zudem lagen in der Arbeitsgruppe fundierte Erfahrungen in der tierexperimentellen Forschung mit Schweinen vor. So wurde das Schweinmodell beispielsweise von Niklason et al.⁷⁵ für die Erforschung von *tissue engineer*ten Substituten genutzt, um die Funktionalität und Beständigkeit der Prothesen beurteilen zu können. Mall et al.⁸⁶ oder Büttemeyer et al.²⁵ konnten gute Erfahrungen mit der Implantation von kleinkalibrigen ePTFE-Gefäßprothesen im Schweinmodell verzeichnen. Wie auch beim Menschen kommt es nur zu einer geringen spontanen Endothelialisierung auf der Prothesenoberfläche.⁸⁷ Nachteil dieses Tiermodells ist das rapide Wachstum der Tiere und somit auch der Gefäße.⁸⁵ In unserem Versuch stellte sich dies als Problem dar, da mit zunehmendem Wachstum der Gefäße auch die Spannung der Gefäßprothese zunahm. Um diese Komplikation zu vermeiden, könnten Zwergschweine als Versuchstiere für die Untersuchung von Gefäßprothesen verwendet werden.

Aus der Studie mussten 2 Versuchstiere ausgeschlossen werden, da die Prothese des Tieres Nummer 97 durch eine Infektion bereits okkludiert war. Eine mögliche Ursache ließ sich anhand der post mortem durchgeführten Eröffnung der Wunde nicht sicher eruieren. Die bei Tier Nummer 36 aufgetretene Abszessbildung an der Venenexplantationsstelle resultierte am ehesten durch ein Scheuern des Tieres an der Stallwand des Tierstalls. Nach der Implantation der Gefäßprothesen wurden am 14.Tag und am 28.Tag Ultraschall Dopplermessungen durchgeführt. Sonographisch konnten bei den endothelialisierten Kollagenmatrix-Gefäßprothesen (37, 38, 48 und 100) wie auch bei den Kontrollgruppen (10, 35) keine Verschlüsse festgestellt werden.

Bei dem Tier Nr. 99 wurden 4 Wochen nach der Operation Dopplerkurven registriert, die eine Stenose der Prothese zeigten. Sowohl der monophasische Verlauf als auch die Amplitudenverringerng und die Spektrumverbreiterung der Flusskurven der A. femoralis des Tieres Nr. 99 sind eindeutige Hinweise auf eine Stenose. Vergleichsweise besteht ein in der Literatur angegebenes Flussprofil der A. femoralis beim Schwein aus einem biphasischen Verlauf und zeigt sowohl ein schmales Spektrum als auch eine erhöhte Amplitude der Flusskurve⁸⁸

Die Studie von Gregory et al.⁸⁹ zeigte ein ähnliches Ergebnis. Dabei lag die Offenheitsrate nach Implantation einer *tissue-engineer*ten Gefäßprothese in die Arteria femoralis

des Schweins bei 89%. Dieses Phänomen lässt sich beispielsweise bei der Arbeit von Niklason et al. nicht nachvollziehen.⁹⁰ Bei allen *tissue-engineerten* Prothesen lag die Offenheitsrate nach 4 Wochen bei 100%. Dies könnte begründet sein durch die Verwendung von Zwergschweinen.

Die in der Literatur angegebene Flussgeschwindigkeit einer nicht operierten A. femoralis beim Schwein liegt bei ca. 58 cm/s.⁸⁸ Im Vergleich wurden zu den in der Literatur angegebenen Flussgeschwindigkeiten bei den Tieren Nr. 37, 38, 48 und 100 akzeptable Flussgeschwindigkeiten gemessen worden. Dabei lag die durchschnittliche Flussgeschwindigkeit am 14. postoperativen Tag bei 56 cm/s und am 28. postoperativen Tag bei 62 cm/s. Die am 28. Tag gemessenen Flussraten zeigten durchschnittlich höhere Werte als am 14. postoperativen Tag. Auch dieses Phänomen lässt sich durch das starke Wachstum erklären. In den 6 Wochen verdoppelte sich das Gewicht. Als Ursachen der teilweise abgeflachten Pulskurven der sonographischen Untersuchung kommen die Abflachung und die geometrische Stenosierung der Prothesen in Betracht.

Histologisch zeigten alle Explantate kein durchgängiges Lumen. Alle waren über die gesamte Länge vollständig mit entzündlichen Infiltraten durchsetzt. Diese wiesen einen hohen Anteil an Fibroblasten und Leukozyten auf, was ein Hinweis auf eine immunologische Reaktion des Empfängerorganismus auf einen Fremdkörper (Kollagenmatrix-Gefäßprothese) ist. Als Bestätigung für die Immunreaktion sind die hohen Leukozytenzahlen, vor allem der Lymphozyten, in den Infiltraten anzusehen. Es ist zu vermuten, dass das bovine Kollagen der Implantate komplett abgebaut wurde. Bei den Kollagenmatrix-Gefäßprothesen wurde im Versuchsverlauf das bovine Kollagen durch Bindegewebe ersetzt. Für eine Abstoßungsreaktion der bovinen Kollagenmatrix-Gefäßprothese spricht auch das typische Bild der Bindegewebsinkapsulierung der als Kontrolle dienenden ePTFE-Gefäßprothese. PTFE ist als immunologisch inaktives Biomaterial bekannt und führt zu keiner Abstoßungs-, sondern nur zu einer Inkapsulierungsreaktion.^{91 92} Um diese These zu untermauern, wären weitere Versuche notwendig, da in dieser Pilotstudie nur eine ePTFE-Prothese verwendet wurde.

Die Ergebnisse der Ultraschalluntersuchungen können jedoch mit dem beschriebenen histologischen Befund nicht erklärt werden. Es könnte sein, dass die Infiltrate ein dichtes Netz an Hohlräumen und Gangsystemen aufweisen, die wie immunhistologische Untersuchungen ergeben, mit Endothelzellen ausgekleidet sind. Darunter wurden jedoch keine charakteristischen Gefäßstrukturen nachgewiesen. Die Gangsysteme scheinen einen limitierten Blutfluss längs des Lumens der Kollagenmatrix-

Gefäßprothesen zugelassen haben, da die Anastomosen gefäßseitig keine Thromben aufwiesen, was bei einer längerfristigen Stase des Blutflusses anzunehmen gewesen wäre. Ursächlich ist eine Immunreaktion zwischen der bovinen Kollagenmatrix-Gefäßprothese und des Empfängerorganismus des Schweins zu diskutieren.

Kollagen als nativer Bestandteil des menschlichen Körpers wirkt gering antigen und kaum inflammatorisch.⁹³ Eine weitere Erklärung für die Abstoßungsreaktion könnte der Reinheitsgehalt des Kollagens sein. In einer Studie mit kollagenbeschichteten Dacron-Prothesen wurde belegt, dass ungereinigtes Kollagen zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion führte.⁹⁴ Kollagenbeschichtete Dacron-Prothesen werden bereits seit Jahren klinisch genutzt.⁹⁵ Während Kollagen eine untergeordnete Rolle in der Funktion dieser Prothesen spielt, konnte dennoch gezeigt werden, dass bovines Kollagen als Prothesenmaterial für Menschen verwendet werden kann.⁹⁶ Zur Vermeidung der Abstoßungsreaktion wäre die Durchführung einer immunsuppressiven Therapie eventuell vorteilhaft. Die Kollagenmatrix-Gefäßprothesen erwiesen sich als ausreichend mechanisch stabil und es kam zu keiner Aneurysmabildung oder Ruptur der Prothesenwandung. Dies erklärt sich durch eine ausreichende Spannungskraft des Kollagens.

Die Anastomosen der implantierten Kollagenmatrix-Gefäßprothesen wiesen einen hämodynamisch ungünstigen Übergang mit der Gefahr von Turbulenzbildungen auf, da die Durchmesser zwischen der Prothese (6 mm) und Arterie (3 mm) stark differierten. Es wird vermutet, dass das Wachstum der Tiere zu einer zunehmenden Spannung der Prothesen führt und diese gegen die Muskulatur gepresst werden. Dieses Compliance - Mismatch wäre jedoch durch die Wahl einer kleineren Schweinerasse eventuell vermeidbar.

Die geringe Elastizität der Prothesen in Längsrichtung verursachte aufgrund des anhaltenden Wachstums der Versuchstiere eine zunehmende Spannung in der Prothese, die vermutlich zu deren Abflachung und partiellen Stenosierung führte.

Natürliche Gefäße verfügen grundsätzlich über eine starke Elastizität.⁹⁷ Während der Systole dehnt sich die normale Arterie um 10% gegenüber ihren diastolischen Werten. Prothesen deren Durchmesser wenig variiert, zeigen eine mangelnde Compliance, so dass es an der Ein- und Ausflusstrombahn zu Turbulenzen mit der Gefahr der SIH kommen kann.¹⁶ Dies führt zu einem Compliance-Mismatch, das eine verringerte distale Perfusion und gestörte Flussbedingungen wie Turbulenzen begünstigt und schließlich zu einer Stenose des Gefäßes führen kann.^{19 40} Zur Optimierung der Kollagenmatrix-Gefäßprothese könnte Elastin in die Prothese eingearbeitet werden, um die mechani-

schen elastischen Eigenschaften zu verbessern. Elastin als nativer Bestandteil der Arterienwand bewirkt Elastizität und Compliance der natürlichen Gefäße. Elastinfasern begünstigen den notwendigen Widerstand, um Drücken standhalten zu können.⁹⁸ Turbulenzbildungen mit geringem Scherstress führen durch die Suppression von PGI₁, NO, tPA, einer Aktivierung der Thrombozytenaggregation und reduzierten Haftung der EC an der extrazellulären Matrix zu einer verstärkten Induktion der Koagulationskaskade.⁹⁹ An der Gefäßwand kommt es zu einer Proliferation von glatten Muskelzellen und zu einer Leukozytenanhaftung, die die Atherogenese fördern.³⁰ Dadurch erhöht sich die Thrombogenität. Histologisch bestanden bei 5 Kollagenmatrix-Gefäßprothesen-Explanten keine Hinweise auf eine Thrombosierung. Nur das Explantat des Tieres Nr.97 zeigte histologisch das morphologische Korrelat einer Thrombenbildung.

Es ist wahrscheinlich, dass Kollagen stark thrombogen ist. Goodwin et al.¹⁰⁰ berichten über hohe Raten an spontaner Thrombosierung. Die hohe Thrombogenität des Kollagens kann durch Quervernetzung mit z.B. Aldehyden¹⁰¹ oder durch die Beschichtung von Heparin reduziert werden.¹⁰² Die Quervernetzung mit Glutaraldehyden kann das Material sterilisieren und eine Immunantwort auf das Material unterdrücken.¹⁰³ Van Wachem et al.¹⁰⁴ demonstrierten, dass EDC/NHC- ((3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS))-quervernetzte Kollagenmatrices nach subkutaner Implantation in Ratten eine geringere Zytotoxizität und Fremdkörperreaktion hervorriefen als nicht quervernetzte Kollagenmatrices.

Zusammenfassend konnten die Offenheit sowie die Biokompatibilität der endothelialisierten Gefäßprothese aufgrund der starken Abstoßungsreaktion nicht mit absoluter Sicherheit überprüft werden. Zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion sollte in weiterführenden Versuchen mit *tissue engineerter* Kollagenmatrix-Gefäßprothesen eine immunsuppressive Therapie erfolgen. Damit könnten die Eigenschaften – wie Biokompatibilität und Funktionalität- der Kollagenmatrix-Gefäßprothese beurteilt werden. In zukünftigen Studien mit Schweinen sollte porcines Kollagen zur Herstellung der Gefäßprothese verwendet werden, um mögliche Fremdkörperreaktionen zu vermeiden. Des Weiteren könnte die Zusammensetzung und Aufarbeitung des Kollagens modifiziert werden. Gegebenenfalls könnte auch die Wahl einer Schweinerasse (Minipigs) zu einer Verbesserung der Offenheitsraten der Prothesen führen.

Wie bereits in einem vorangegangenen Abschnitt erwähnt, geht ein ungünstiger hämodynamischer Übergang an der Anastomosenausflussbahn mit der Gefahr von Turbulenzbildungen und einer daraus resultierenden Ausbildung der SIH sowie Thromben-

bildung einher. Für die Optimierung der hämodynamischen Verhältnisse am Implantationsort sollten der Prothesendurchmesser mit dem des Gefäßes identisch sein. Daher wird eine Reduzierung des Prothesendurchmessers auf maximal 4 mm empfohlen. Des Weiteren ist zu überlegen, inwieweit die außenseitige Besiedlung der Kollagenmatrix-Gefäßprothesen mit Myofibroblasten bei der derzeitigen hochporigen Struktur des Kollagens als zielführend angesehen werden kann. Nach Modifikation des Kollagenprothesenaufbaus sollten in einem zukünftigen Versuch zwei Teilgruppen (mit / und ohne Myofibroblasten auf der Außenseite der Prothesen) gebildet werden, um den Einfluss der Myofibroblasten auf den Umbau der Prothesen beurteilen zu können.

5 Zusammenfassung

Mit der steigenden Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen steigt auch die Anzahl jährlich durchgeführter Bypassoperationen. Neben dem autologen Bypassmaterial, wie der Vena saphena magna, werden auch synthetisch hergestellte Prothesen wie ePTFE- und Dacron-Prothesen insbesondere für großkalibrige Gefäße, erfolgreich klinisch eingesetzt. Aufgrund früher Thrombenbildung, Infektionen oder der Ausbildung einer subendothelialen Intimahyperplasie (SIH), liegt die 5-Jahresoffenheitsrate für den kleinkalibrigen Gefäßersatz jedoch nur bei 40-50%. Eine Alternative zu synthetischen Prothesen ist die Entwicklung von „tissue engineerten“ bioartifiziellen Gefäßprothesen für den kleinkalibrigen Gefäßersatz.

Das Ziel der vorliegenden Pilotstudie war es, das in-vivo Verhalten, die Biokompatibilität sowie die Offenheitsrate einer unter Fluss endothelialisierten großporigen Kollagenmatrix-Gefäßprothese aus bovinen Typ 1- Kollagen zu untersuchen. Nach vorheriger Venenentnahme zur EC-Gewinnung und Endothelialisierung der Versuchsprothesen erfolgte in einem 6-wöchigen Tierversuch die Implantation endothelialisierter und mit Myofibroblasten besiedelter Kollagenmatrix-Gefäßprothesen in die Arteria femoralis superficialis von 6 Schweinen. Zur Kontrolle diente eine nicht endothelialisierte Kollagenmatrix-Gefäßprothese sowie eine ePTFE-Prothese. Dopplersonographisch zeigten alle Prothesen der untersuchten Gruppe nach 14 sowie nach 28 Tagen gute Offenheitsraten.

Dabei lag die durchschnittliche Durchflussrate vor der Explantation am 14. postoperativen Tag bei 56 cm/s und am 28. postoperativen Tag bei 62 cm/s. Nur die sonographische Flusskurve des Tieres Nr.99 zeigte vier Wochen nach der Implantation Hinweise auf eine Stenose. Die sonographischen Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den histologischen Ergebnissen. Die generell follikulären entzündlichen mononukleären Infiltrate mit einem hohen Anteil an Leukozyten sowie Fibroblasten sind als eindeutige Hinweise auf eine Abstoßungsreaktion auf das bovine Kollagen zu werten. Das Explantat der ePTFE-Gefäßprothese wies im Gegensatz zu den Explantaten der Kollagenmatrix-Gefäßprothesen typische diffuse entzündliche Infiltrationen auf. Aufgrund der starken Abstoßungsreaktion konnte die Offenheit der endothelialisierten Gefäßprothese nicht mit Sicherheit überprüft werden. Die Anastomosen der Gefäßprothesen wiesen einen hämodynamisch ungünstigen Übergang auf, da die Durchmesser zwischen Prothese und der Arterie stark differierten. Histologisch bestand nur bei dem Explantat des Tieres Nr.97 das morphologische Korrelat einer Thrombenbildung. Die Kollagenmatrix-Gefäßprothesen erwiesen sich als ausreichend mechanisch stabil und es kam zu keiner

Aneurysmabildung oder Ruptur der Prothesenwandung. Ziel zukünftiger Versuche mit Kollagenmatrix-Gefäßprothesen sollte die Modifikation und Optimierung des in-vitro Systems sein, um die Prothese in Struktur und Beschaffenheit zu verbessern. Zur Beurteilung des Einflusses der Myofibroblasten auf die Struktur und das Einwachsen der Prothesen, sollten Versuche mit und ohne Beschichtung von Myofibroblasten auf der Außenoberfläche der Prothese erfolgen. Um ein Compliance-Mismatch resultierend aus dem rapiden Wachstum der Schweine und somit auch des Gefäßsystems und der implantierten Gefäßprothesen zu vermeiden, könnte ein Tiermodell mit Zwergschweinen verwendet werden. Des Weiteren sollte das Studiendesign so optimiert werden, dass die Kollagenmatrix-Gefäßprothese in ihrer Biokompatibilität und Funktionalität beurteilt werden kann. Dabei wären unter anderem eine Immunsuppression zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion sowie identische Durchmesser zwischen Prothese und Arterie anzustreben. Erst mittels dieser Zusatztherapie kann die Eignung der endothelialisierten Gefäßprothese als Gefäßersatz sicher überprüft werden.

6 Literatur

- ¹ World Health Organisation. Atlas of heart disease, September 2002. At http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_01_types.pdf.
- ² American Heart Association. Heart and stroke facts: Statistical Update 2007. At <http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1168612193463INTL07.pdf>.
- ³ Caplice NM. The Artificial artery. *Curr Interv Cardiol Rep* 2000 Feb;2:7-10.
- ⁴ Pomposelli FB Jr, Arora S, Gibbons GW, et al. Lower extremity arterial reconstruction in the very elderly: Successful outcome preserves not only the limb but also residential status and ambulatory function. *J Vasc Surg* 1998;28:215-25.
- ⁵ Kesteloot H, Sans S, Kromhout D. Dynamics of cardiovascular and all-cause mortality in Western and Eastern Europe between 1970 and 2000. *Eur Heart J* 2006;27:107-13.
- ⁶ Thomas AC, Campbell GR, Campbell JH. Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovasc Pathol* 2003;12:271-6.
- ⁷ Veith FJ, Gupta SK, Ascer E, et al. Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. *J Vasc Surg* 1986;3:104-14.
- ⁸ Veith FJ, Moss CM, Montefusco C. Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity. *Surgery* 1979;85:253-6.
- ⁹ Bordenave L, Fernandez PH, Rémy-Zolghadri M, et al. In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005;33:227-34.
- ¹⁰ Pevec WC, Darling RC, L'Italien GJ, et al. Femoropopliteal reconstruction with knitted, nonvelour Dacron versus expanded polytetrafluoroethylene. *J Vasc Surg* 1992;16:60-5.
- ¹¹ Wilson YG, Wyatt MG, Currie IC, et al. Preferential use of vein for above-knee femoropopliteal grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995;10:220-5.
- ¹² Watelet J, Soury P, Menard JF, et al. Femoropopliteal bypass: in situ or reversed vein grafts? Ten-year results of a randomized prospective study. *Ann Vasc Surg* 1997;11:510-9.

-
- ¹³ Trubel W, Schima H, Czerny M, et al. Experimental comparison of four methods of end-to-side anastomosis with expanded polytetrafluoroethylene. *Br J Surg* 2004;91:159-67.
- ¹⁴ Christenson JT, Broome A, Norgren L, et al. Revascularization of popliteal and below-knee arteries with polytetrafluoroethylene. *Surgery* 1985;97:141-9.
- ¹⁵ Koch G, Gutsch S, Pascher O, et al. Femoropopliteal vascular replacement: Vein, ePTFE or ovine collagen? *Zentralbl Chir* 1996;121:761-7.
- ¹⁶ Erasmi H, Horsch S, Müller J, et al. Gefäßersatz bei kleinkalibrigen Arterien- eine neue bovine Kollagenprothese. *Langbeck`s Archives of Surgery* 1983;360:97-107.
- ¹⁷ Yoshida H, Sasajima T, Goh K, et al. Early results of a reinforced biosynthetic ovine collagen vascular prosthesis for small arterial reconstruction. *Surg Today* 1996;26:262-6.
- ¹⁸ Ballermann BJ, Ott MJ. Adhesion and differentiation of endothelial cells by exposure to chronic shear stress : a vascular graft model. *Blood Purif* 1995;13:125-134.
- ¹⁹ Clowes AW. Intimal hyperplasia and graft failure. *Cardiovasc Pathol* 1993;2:179-86.
- ²⁰ Echave V, Koornick AR, Haimov M, et al. Intimal hyperplasia as a complication of the use of the polytetrafluoroethylene graft for femoral-popliteal bypass. *Surgery* 1979;86:791-8.
- ²¹ Randone B, Cucina A, Graziano P, et al. Suppression of smooth muscle cell proliferation after experimental PTFE arterial grafting: a role for polyclonal anti-basic fibroblast growth factor (bFGF) antibody. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1998;16:401-7.
- ²² Dardik A, Liu A, Ballermann BJ. Chronic in vitro shear stress stimulates endothelial cell retention on prosthetic vascular grafts and reduces subsequent in vivo neointimal thickness. *J Vasc Surg* 1999;29:157-67.
- ²³ Berger K, Sauvage LR, Rao Am, et al. Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness. *Ann Surg.* 1972;175:118-27.
- ²⁴ Zilla P, Deutsch M, Meinhart J, et al. Clinical in vitro endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow-up over three years. *J Vasc Surg* 1994;19:540-8.

-
- ²⁵ Büttemeyer R, Mall JW, Paulitschke M, et al. In a pig model ePTFE grafts will sustain for 6 weeks a confluent endothelial cell layer formed in vitro under shear stress conditions. *Eur J Endovasc Surg* 2003;26:156-60.
- ²⁶ Laube HR, Duwe J, Rutsch W, et al. Clinical experience with autologous cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:134-41.
- ²⁷ Vohara RK, Thomson GJ, Sharma H, et al. Effects of shear stress on endothelial cell monolayers on expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) grafts using preclot and fibronectin matrices. *Eur J Vasc Surg* 1990;4:33-41.
- ²⁸ Seifalian AM, Tiwari A, Hamilton G, et al. Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary grafts: the role of seeding and tissue engineering. *Artif Organs* 2002;26:307-20.
- ²⁹ Hsu S, Tsai I, Lin D, et al. The effect of dynamic culture conditions on endothelial cell seeding and retention on small diameter polyurethane vascular grafts. *Med Eng Phys* 2005;27:267-272.
- ³⁰ Paszkowiak JJ, Dardik A. Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside. *Vasc Endovasc Surg* 2003;37:47-57.
- ³¹ Kaehler J, Zilla P, Fasol R, et al. Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg* 1989;9:535-41.
- ³² Nerem RM, Seliktar D. Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 2001;3:225-43.
- ³³ Bou-Gharios G, Ponticos M, Rajkumar V, Abraham D. Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell Proliferation* 2004;37:207-20.
- ³⁴ Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, et al. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol (Paris)* 2001;49(4):326-32.
- ³⁵ Bassiouny HS, White S, Glagov S, et al. Anastomotic intimal hyperplasia: mechanical injury or flow induced. *J Vasc Surg* 1992;15:708-16.
- ³⁶ Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg* 1994;81:1254-69.

-
- 37 Lemson MS, Tordoir JHM, Daemen MJ, et al. Intimal hyperplasia in vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19:336-50.
- 38 Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E. Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppresses intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest* 1994;93:1172-8.
- 39 Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, et al. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J Vasc Surg* 1987;5:376-82.
- 40 Dobrin PB, Littooy FN, Endean ED. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery* 1988;44:259-65.
- 41 Binns RL, Ku DN, Stewart MT, et al. Optimal graft diameter: effect of wall shear stress on vascular healing. *J Vasc Surg* 1989;10:326-37.
- 42 Williams SK. Endothelial cell transplantation. *Cell Transplant* 1995;4:401-10.
- 43 LoGerfo FW, Quist WC, Nowak MD, et al. Downstream anastomotic hyperplasia. A mechanism of failure in Dacron arterial grafts. *Ann Surg* 1983;197:479-83.
- 44 Imperato AM, Bracco A, Kim GE, et al. Intimal and neointimal fibrous proliferation causing failure of arterial reconstruction. *Surgery* 1972;72:1007-17.
- 45 Herring MB. Endothelial cell seeding. *J Vasc Surg* 1991;13:731-2.
- 46 Herring M, Smith J, Dalsing M, et al. Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene femoral popliteal bypasses: The failure of low-density seeding to improve patency. *J Vasc Surg* 1994;20:650-5.
- 47 Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, et al. Shear stress and the endothelium. *Kidney International* 1998;67:100-8.
- 48 Masatsugo K, Itho H, Chun TH, et al. Physiologic shear stress suppresses endothelin-converting enzyme-1 expression in vascular endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmac* 1998;31:42-45.
- 49 Baguneid MS, Seifalian AM, Salacinski HJ, et al. Tissue engineering of blood vessels. *Br J Surgery* 2006;93:282-90.
- 50 Vacanti CA, Vacanti JP. The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000;31:351-6.

-
- ⁵¹ Vacanti JP. Tissue and organ engineering: can we build intestine and vital organs? *J Gastrointest Surg* 2003;7:831-5.
- ⁵² Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng* 2004;32:112-22.
- ⁵³ Marlovits S, Tichy B, Truppe M, et al. Chondrogenesis of aged human articular cartilage in a scaffold-free bioreactor. *Tissue Eng* 2003;9:1215-26.
- ⁵⁴ Braddock M, Schwachtgen JL, Houston P, et al. Fluid shear stress modulation of gene expression in endothelial cells. *News Physiol Sci* 1998;13:241-46.
- ⁵⁵ Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 2001;7:1035-40.
- ⁵⁶ Chien S, Li S, Shyy JYJ. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension* 1998;31:162-69.
- ⁵⁷ Massia SP, Hubbell JA. Tissue engineering in the vascular graft. *Cytotechnology* 1992;10:189-204.
- ⁵⁸ Vinard E, Leseche G, Andreassian B, et al. In vitro endothelialization of PTFE vascular grafts: A comparison of various substrates, cell densities, and incubation times. *Ann Vasc Surg* 1999;13:141-150.
- ⁵⁹ Muller-Glauser W, Zilla P, Lachat M, et al. Immediate shear stress resistance of endothelial monolayers seeded in vitro on fibrin glue-coated ePTFE prostheses. *Eur J Vasc Surg* 1993;7:324-28.
- ⁶⁰ Baguneid M, Murray D, Salacinski HJ, et al. Shear-stress preconditioning and tissue-engineering-based paradigms for generating arterial substitutes. *Biotechnol Appl Biochem* 2004;39:151-7.
- ⁶¹ Langille BL, O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 1986;231:405-7.
- ⁶² Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994;330:1431-38.

-
- ⁶³ Resnick N, Gimbrone MA Jr. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J* 1995;9:874-82.
- ⁶⁴ Topper JN, Gimbrone MA Jr. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today* 1999;5:40-6.
- ⁶⁵ Pachence JM. Collagen-based devices for soft tissue repair. *J Biomed Mater Res* 1996;33:35-40.
- ⁶⁶ Ziegler T, Nerem RM. Tissue engineering a blood vessel: regulation of vascular biology by mechanical stresses. *J Cell Biochem* 1994;56:204-9.
- ⁶⁷ Mayne R. Collagenous proteins of blood vessels. *Arteriosclerosis* 1986 ;6:585-93.
- ⁶⁸ Cloft HJ, Kallmes DF, Lin HB, et al. Bovine type I collagen as an endovascular stent-graft material: Biocompatibility study in rabbits. *Radiology* 2000;214:557-62.
- ⁶⁹ Bacákocá L, Filová E, Rypáček F, et al. Cell Adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res* 2004;53:S35-45.
- ⁷⁰ Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 1986;231:397-400.
- ⁷¹ Lantz GC, Badylak SF, Hiles MC, et al. Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review. *J Invest Surg* 1993;6:297-310.
- ⁷² Huynh T, Abraham G, Murray J, et al. Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. *Nat Biotechnol* 1999;17:1083-6.
- ⁷³ L'Heurreux N, Paquet S, Labbe R, et al. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 1998;12:47-56.
- ⁷⁴ Niklason LE, Abbott W, Gao J, et al. Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. *J Vas Surg* 2001;33:628-38.
- ⁷⁵ Niklason LE, Gao J, Abbott WM, et al. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999;284:489-93.

-
- 76 Meinhart JG, Deutsch M, Fischlein T, et al. Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Ann Thorac Surg* 2001;71:327-31.
- 77 Mayne R. Collagenous proteins of blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1986;6:585-93.
- 78 Bacakovaf L, Filova E, Rypacek F, et al. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res* 2004;53:35-45.
- 79 Jalali S, del Pozo MA, Chen K, et al. Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1042-6.
- 80 Turner NJ, Murphy MO, Kielty CM, et al. $\alpha 2$ (VIII) collagen substrata enhance endothelial cell retention under acute shear stress flow via an $\alpha 2\beta 1$ integrin-dependent mechanism. An in vitro in vivo study. *Circulation* 2006;114:820-29.
- 81 Pratt KJ, Jarrell B, Williams SK, et al. Kinetics of endothelial cell-surface attachment forces. *J Vasc Surg* 1988;7:591-9.
- 82 Pratt BM, Harris AS, Morrow JS, et al. Mechanisms of cytoskeletal regulation. Modulation of aortic endothelial cell spectrin by the extracellular matrix. *Am J Pathol* 1984;117:349-54.
- 83 Feugier P, Black RA, Hunt JA, et al. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials* 2005;26:1457-66.
- 84 Fujiwara NH, Kallmes DF, Li ST, et al. Type 1 Collagen as an endovascular stent-graft material for small-diameter vessels: a biocompatibility study. *J Vasc Interv Radiol* 2005;16:1229-36.
- 85 Rashid ST, Salacinski HJ, Hamilton G, et al. The use of animal models in developing the discipline of cardiovascular tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2004;25:1627-37.
- 86 Mall JW, Phillip AW, Rademacher A, et al. Re-endothelialization of punctured ePTFE graft: an in vitro study under pulsed perfusion conditions. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:61-67.
- 87 Williams SK, Jarrell BE. Tissue engineered vascular grafts. *Nature Med* 1996;2:32-4.
- 88 Fernández del Palacio MJ, Luis Fuentes V, Bonagura JD et al. Evaluation of transcutaneous Doppler ultrasonography for the measurement of blood flow in the femoral artery of pigs. *Am J Vet Res*. 2003;64:43-50.

-
- ⁸⁹ Borschel GH, Huang YC, Calve S et al. Tissue Engineering of Recellularized Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Eng.* 2005;11:778-86.
- ⁹⁰ Niklason LE, Gao J, Abbott WM et al. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999;284:289-93.
- ⁹¹ Bellón JM, Buján J, Conteras LA, et al. In behavior of polyfluoroethylene (ePTFE) prostheses implanted into different interfaces. *J Biomed Mater Res* 1996;31:1-9.
- ⁹² Buján J, Conteras LA, Carrera-SAN Martín A et al. The behavior of different types of polytetrafluoroethylene (PTFE) prostheses in the reparative scarring process of abdominal wall defects. *Histol Histopathol* 1997;12:683-90.
- ⁹³ Pachence JM. Collagen-based devices for soft tissue repair. *J Biomed Mater Res* 1996;33:35-40.
- ⁹⁴ Yamamoto K, Noishiki Y, Mo M, et al. Unusual inflammatory responses around a collagen-impregnated vascular prosthesis. *Artif Organs* 1993;17:1010-6.
- ⁹⁵ Guidon R, Marceau D, Couture J, et al. Collagen coatings as biological sealants for textile arterial prostheses. *Biomaterials* 1989;10:156-65.
- ⁹⁶ Tolan M, Wells F, Kendall S, et al. Clinical experience with a collagen impregnated woven Dacron graft. *J Cardiovasc Surg* 1995;36:323-7.
- ⁹⁷ Paasche PE, Kinley CE, Dolan FG, et al. Consideration of suture line stresses in the selection of synthetic grafts for implantation. *J Biomech* 1973;6:253-9.
- ⁹⁸ Berglund JD, Nerem RM, Sambanis A. Incorporation of intact elastin scaffolds in tissue-engineered collagen-based vascular grafts. *Tissue Eng* 2004;10:1526-35.
- ⁹⁹ O, Berk BC. Laminar shear stress. Mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:677-85.
- ¹⁰⁰ Goodwin SC, Yoon HC, Wong GC, et al. Percutaneous delivery of a heparin-impregnated collagen stent-graft in a porcine model of atherosclerotic disease. *Invest Radiol* 2000;35:420-25.
- ¹⁰¹ Baugh RF, Hougie C. The chemistry of blood coagulation. *Clin Haematol* 1979;8:3-30.

¹⁰² Blezer R, Cahalan L, Cahalan PT, et al. Heparin coating of tantalum coronary stents reduces surface thrombin generation but not factor a generation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9:435–440.

¹⁰³ Yannas IV. Natural Biomaterials. In: Ratner BD, Hoffmann AS, Schoen FJ, LemonsJE, eds. *Biomaterials Science*. San Diego, Calif: Academic Press, 1996:84-94.

¹⁰⁴ Van Wachem PB, Plantinga JA, Wissink MJB, et al. In vivo biocompatibility of carbodiimide-crosslinked collagen matrices: effects of crosslink density, heparin immobilization and bFGF loading. *J Biomed Mater Res* 2001;55:368-78.

Danksagung

Ich danke dem Leiter unserer Arbeitsgruppe, Herrn Privatdozenten Dr. med. J. W. Mall, für die Realisierung dieser Dissertation, für seine Unterstützung sowie seine wissenschaftlichen Ratschläge.

Ich danke Herrn Dr. med. M. Paulitschke für seine Unterstützung bei dem Erlernen der Kultivierungs- und Beschichtungsdurchführung sowie der Bereitstellung von Materialien.

Insbesondere meinen Eltern und Hendrik bin ich zu tiefstem Dank verpflichtet, denn sie haben während des gesamten Medizinstudiums stets an mich geglaubt und mich mit weitreichendem Verständnis unterstützt.

Weiterhin haben Anne, Karl, Mareike sowie Kai mit wertvollen Anregungen zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Vielen Dank.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Ines Fitschen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Pilotstudie zum in-vivo Verhalten von unter Fluss endothelialisierten Kollagenmatrix-Gefäßprothesen im Schweinmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum:

Ines Fitschen

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Anhang

Chemikalien, Materialien und Geräte

1. Chemikalien (Bezugsquelle)

- Amphotericin B (Biochrom AG)
- Collagenase P (Roche Diagnostics GmbH)
- Dulbecco´s PBS w/o Ca, Mg (Biochrom AG)
- Endothelial Cell Growth Medium / Supplement Mix-ECGM (PromoCell GmbH)
- Fetal Calf Serum (Biochrom AG)
- Haematoxylin - Lösung (Fluka GmbH)
- Heparin (Biochrom KG)
- Hepes (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure) -Buffer (Biochrom AG)
- L-Glutamin (Biochrom AG)
- Penicillin / Streptomycin (Biochrom AG)
- RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Tissucol.-Kit (Immuno GmbH)
- Trypsin / EDTA Solution (10x) (Biochrom AG)
- Ultra pure water (Biochrom AG)

2. Materialien (Bezugsquelle)

- Kollagenmatrix-Gefäßprothese (Coll-Graft) (Jotec GmbH)
- ePTFE Vascular Graft I.D.4mm, Model:T04030C30 (Baxter Deutschland GmbH)
- Luer-Schlauchverbinder, Polypropylen (novodirect GmbH)
- Silikonperoxid-Schlauch ID 3,2 mm (novodirect GmbH)
- Pumpenschlauch 2-Stopp, Silikon, ID 3,0 mm (Merck Eurolab GmbH)

3. Geräte (Hersteller)

-
- Brutschrank IG 150 (Jouan GmbH)
 - Cell-Counter CASY 1 TTC (Schärfe System GmbH)
 - Digitalkamera CCD-IRIS (Sony)
 - Digitalkamera Dyna 1000 (Minolta)
 - Laminar-Flow-Hood -Sicherheitswerkbank STERIL-ANTARES 72 (Biohit GmbH)
 - Mikroskop Axiovert 25 (Carl Zeiss Jena GmbH)
 - Peristaltikpumpe IPC ISM 761, (Ismatec. Laboratoriumstechnik GmbH) mit
 - Steuer-Software (Cell-Lining GmbH jetzt Vaso Tissue Technologies GmbH)
 - Präzisionswaage, elektronisch, Kern 824 (Kern GmbH)
 - Tube Chamber TCS² (Vaso Tissue Technologies GmbH)
 - Rolling Unit for TCS²Roller (Cell-Lining GmbH jetzt VasoTissue Technologies GmbH)
 - Wasserbad W12 (Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH)
 - Zellkulturflaschen mit Gasaustausch-Kappe, (Techno Plastics Products AG)
 - Zentrifuge Labofuge 400 (Heraeus Instruments GmbH)

4. Zusammensetzung der verwendeten Medien

(Angabe der Endkonzentration der Supplemente):

Dulbecco's Modified Eagle Medium

(500 ml)

- 25 .g Amphotericin B (0,05 .g/ml)
- 5 ml Heparin (1000U/ml) in Zellkultur-getestetem Wasser (50 U/ml)
- 50 ml FCS (10 %)
- 10 ml L-Glutamin 200 mM (4 mM)
- 10 ml HEPES 1M (0,02 M)
- 5 ml Pen/Strep (100 U/100µg/ml)

ECGM: Bestandteile des Supplement MIX(500 ml):

- ECGS/H (0,4 %)
- FCS (2 %)
- Epidermal Growth Factor 0,1 ng/ml

-
- Basic Fibroblast Factor (1 ng/ml)
 - Amphotericin B (50 ng/ml)
 - Gentamicin (50 .g/ml)