

Heiko Tobias Ziegler

Dr. med.

## **Proteinbeschichtung dezellularisierter Herzklappensegel zur Optimierung der In-vitro-Re-Endothelialisierung zum Tissue Engineering von Herzklappen**

Promotionsfach: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Das Tissue Engineering von Herzklappen erwies sich in den letzten Jahren als eine der vielversprechendsten und zielführendsten Lösungen für das Generieren eines idealen Herzklappenersatzes. Die Optimierung der Re-Endothelialisierung spielt dabei eine elementare Rolle und ist bei der Konditionierung von Klappenkonstrukten in einem Bioreaktor von fundamentaler Bedeutung. In dieser Dissertationsarbeit sollte untersucht werden, ob die Re-Endothelialisierung von dezellularisierten Pulmonalklappensegeln mit bioaktiven Beschichtungsstrategien gefördert und optimiert werden kann.

Zunächst sollten verschiedene Isolationsmöglichkeiten von ovinen Endothelzellen dahingehend untersucht werden, welche sich für Re-Endothelialisierungsexperimente als geeignet und praktikabel erweisen. Hierfür wurden Protokolle zur enzymatischen Isolation aus Venen und Arterien und zur Isolation von endothelialen Progenitorzellen aus peripherem Blut gegenübergestellt. Als Entscheidungskriterien dienten der Anteil an Endothelzellen, welcher durch immunhistologische Färbungen bestimmt wurden, die Erfolgsrate und die Praktikabilität der Isolationsmethoden. In einem zweiten Schritt sollten die zu prüfenden, bioaktiven Beschichtungsproteine bezüglich ihrer Einflüsse sowohl auf die initiale Endothelzelladhärenz, als auch auf den zellulären Vitalitäts- und Differenzierungsstatus während einer protrahierten In-vitro-Expansion in einem zwei-dimensionalen Besiedlungsmodell untersucht werden. Als Beschichtungsproteine wurden synthetisches und natürliches Laminin, Fibronectin, Gelatine und Fibrin untersucht, wobei unbehandelte Oberflächen als Kontrolle dienten. Während der protrahierten In-vitro-Expansion wurde der Vitalitätsstatus durch die Bestimmung der Stoffwechselaktivität mittels MTS-Assay und des Apoptoseparameters PARP beurteilt. Der Differenzierungsstatus wurde durch den Nachweis der endothelspezifischen Proteine eNOS und vWF bestimmt. Die Bestimmungen erfolgten repetitiv zu einem frühen, mittleren und späten Zeitpunkt der bis zu über 8 Passagen dauernden Kultivierungsphase. Um die daraus gewonnenen Erkenntnisse auch auf eine drei-dimensionale Matrixbesiedlung zu übertragen bedurfte es der Verwendung und Etablierung einer neuartigen und speziellen Besiedlungs-Disc (EECD), welche es universell ermöglichte, Matrixarten definiert und kontrolliert zu besiedeln und in vitro zu evaluieren. Im

entscheidenden Teil der Arbeit sollten mit Hilfe der EECD die Beschichtungseinflüsse in einem drei-dimensionalen Modell untersucht werden. Hierfür wurden porcine Pulmonalklappen mittels einer Detergenzienkombination dezellularisiert. Die daraus gewonnenen Segel dienten als xenogene Matrices für die Re-Endothelialisierungsversuche. Die Evaluation der Beschichtungseinflüsse erfolgte durch konfokale Laserscanningmikroskopie und Raster-Elektronenmikroskopie, durch die Bestimmung der Stoffwechselaktivität und durch die Bestimmung der exprimierten, endothelzellspezifischen Proteine eNOS und vWF.

Anhand der Ergebnisse erwies sich die Endothelzellisolation aus Gefäßen, speziellen aus den Venen, als die beste Isolationsmethode für die vorliegende Dissertationsarbeit, da sich diese Methode besonders gut für planungssichere und koordinierbare Experimente eignete und klinisch praktikabel erscheint. Im zwei-dimensionalen Kultivierungsmodell zeigten die untersuchten Beschichtungsstrategien eine Förderung der initialen Endothelzelladhärenz. Dies war besonders deutlich in den ersten 6 Stunden bei den Beschichtungsproteinen Fibronectin, Fibrin und Gelatine. Während der protrahierten In-vitro-Expansion konnte der zelluläre Vitalitäts- und Differenzierungsstatus bei allen Beschichtungen aufrechterhalten werden. Mit der erfolgreichen Anwendung und Etablierung der EECD war es möglich, die Beschichtungsstrategien im drei-dimensionalen Modell zu evaluieren. Hier konnte gezeigt werden, dass durch die Beschichtungsstrategien auch die Re-Endothelialisierung der xenogenen, dezellularisierten Segelmatrices gefördert werden konnten. Diese Verbesserung konnte während der initialen Adhärenzphase der ersten 48 Stunden beobachtet werden. Die Beschichtungen Fibronectin, Fibrin und Gelatine zeigten hierbei die besten Adhärenzeigenschaften. Überraschenderweise waren die Unterschiede der Beschichtungsvarianten zu der unbeschichteten Kontrollmatrix mit zunehmender Kultivierungsdauer am prominentesten. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Beschichtungen ausgeglichener als im zwei-dimensionalen Modell. Der Vitalitäts- und Differenzierungsstatus war unabhängig von der Beschichtung vergleichbar und konnte somit während der initialen Re-Endothelialisierung aufrechterhalten werden.

Die initiale Endothelzelladhärenz und die Re-Endothelialisierung von xenogenen, dezellularisierten Segelmatrices aus Pulmonalklappen konnten durch die angewandten und untersuchten Beschichtungsstrategien gefördert und verbessert werden, wobei die besten Ergebnisse mit den Beschichtungsproteinen Fibronectin, Fibrin und Gelatine erzielt wurden. Diese bioaktiven Beschichtungsstrategien haben das Potenzial, durch die Modifizierung und Optimierung der Oberflächen dezellularisierter Herzklappenmatrices die autologe Re-Endothelialisierung sowohl in vitro bei der Anwendung von Bioreaktoren, als auch in vivo maßgeblich zu fördern und zu verbessern.