

Stefanie Aubin

Dr. med.

Etablierung und Charakterisierung eines voll automatisierten computergesteuerten Bioreaktors zur Rebesiedelung von dezellularisierten Herzklappen mit Endothelzellen unter physiologischen Parametern und Flussbedingungen

Fach/Einrichtung: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung und Charakterisierung eines voll automatisierten, computergesteuerten Bioreaktorsystems zur Herstellung in vitro besiedelter und physiologisch stimulierter Herzklappen für den klinischen Einsatz als Herzklappenersatz. Die Konstruktion und die Optimierung des innovativen BR bzw. des dazugehörigen Computersystems verlaufen anhand diverser Tests und Vorversuche und liefern die Basis für den weiterführenden Etablierungsprozess.

Zur Etablierung des BR werden ovine Pulmonalklappen mittels einer Detergenzlösung (0,5% SDS, 0,5% DCA, Aqua dest.) dezellularisiert und dienen als extrazelluläres Gerüstmaterial für die Rebesiedelung mit Zellen. Das benötigte Zellmaterial wird aus ovinen Jugularvenen unter sterilen Bedingungen isoliert und anschließend bis zum Erreichen der benötigten Zellzahl von 10^7 Zellen kultiviert. Die dynamisch durchgeführte Rebesiedelung der Matrix, wird durch ein speziell angefertigtes, rotierendes Drehgerät mit 3 Umdrehungen/Minute über 48 h ermöglicht. Das Herzstück des Perfusionssystems des BR, die klappentragende Bioreaktorkammer, dient bei der dynamischen Rebesiedelung als Kulturkammer und wird anschließend in das gesamte System integriert. Unter physiologischen Fluss- und Umweltbedingungen findet dann die computergesteuerte Stimulation im optimierten BR statt. Das hier angewandte voll automatisierte System gewährleistet die Aufrechterhaltung bzw. die bedarfsgerechte Anpassung des Kulturmilieus in Bezug auf die Druckverhältnisse von CO₂ und Luft, den pH-Wert im System und die Temperatur entsprechend eines „lebenden Organismus“. Nach einer Laufzeit von 7 Tagen stellt sich die wiederbesiedelte Segeloberfläche optisch als ein konfluenter Zellrasen, aus lebenden kopfsteinpflasterartigen Zellen (Rasterelektronenmikroskopie) dar, dessen endotheliale Herkunft mittels positivem Proteinnachweis von eNOS und vWF bestätigt wird. Die erfolgreich verbesserte Adhärenz

des Endotheliums lässt sich anhand der gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen (N-Cadherin, β -Catenin) im Westernblot nachweisen.

Das im Rahmen dieser Promotionsarbeit etablierte Bioreaktorsystem ermöglicht ein standardisiertes Verfahren zur kompletten Endothelialisierung einer dezellularisierten Matrix mittels physiologischen Fluss- und Umweltbedingungen.