

## Langfristige Gewebekultur von menschlichen normalen und atherosclerotischen Arterienexplantaten\*

A.K. Horsch, H.G. Eber und U. Römmle

Medizinische Universitätsklinik Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Schettler)

### Long-Term Tissue Culture of Normal and Atherosclerotic Human Arterial Explants

**Summary.** A method for longterm tissue culture of human arterial explants is described. The explants of normal and atherosclerotic femoral arteries, removed immediately post mortem, were kept in culture for up to 14 days in a biochemically active state. Viability was checked by glucose uptake and lactate production, with daily changes of incubation media and sterility controls. Compared to the well established short term incubation systems where metabolic activity decreases progressively after 6 h, glucose uptake, lactate production and uptake of  $^3\text{H}$ -oleic acid are linear within 4–14 h. The highest incorporation of  $^3\text{H}$ -oleic acid is found in phospholipids, the lowest in cholesterol ester. But whilst activity, after the pulse label of 24 h, progressively decreases in phospholipids, it constantly increases in the cholesterol ester fraction as a consequence of the persistant cholesterol esterification.

**Key words:** Tissue culture — Arterial wall — Atherosclerosis.

**Zusammenfassung.** Es wird eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, nach unmittelbar postmortaler Entnahme Explantate normaler und atherosclerotischer menschlicher Femoralarterien bis zu 14 Tagen bei gleichbleibender Stoffwechselaktivität in Kultur zu halten. Als Kriterien für die Lebensfähigkeit des Gewebes — bei täglichem Wechsel der Inkubationsmedien und Sterilitätskontrollen — werden Glucoseaufnahme und Lactatbildung der einzelnen Explantate angesehen.

Der Vergleich mit bisher bekannten Kurzzeitgewebekulturmethoden zeigt, daß Glucoseaufnahme, Lactatbildung und der Einbau von  $^3\text{H}$ -Ölsäure in dem Zeitraum von 4–24 h linear verlaufen, während die Stoffwechselaktivität der Arteriensegmente in der Kurzkultur nach 6 h kontinuierlich abfällt.

\* Herrn Prof. Dr. Dr. hc. G. Schettler zum 60. Geburtstag

Sonderdruckanforderungen an: Dr. A. Horsch, Klinikum der Universität Heidelberg, Medizinische Klinik, Bergheimer Str. 58, 6900 Heidelberg 1, Bundesrepublik, Deutschland

In der langfristigen Gewebekultur fand sich der höchste Einbau von  $^3\text{H}$ -Ölsäure in die Phospholipide, der geringste in die Cholesterinester, aber während die Aktivität in den Phospholipiden kontinuierlich abnahm, stieg sie in den Cholesterinestern als Ausdruck einer fortdauernden intramuralen Cholesterinveresterung an.

## Einleitung

Die erste Gewebekultur von Arterien wurde mit Katzen- und Hundearten durchgeführt (Carrel und Burrows, 1910), aber die Verbindung zur Atherosclerosisforschung ergab sich erst später (Simms et al., 1954; Lazzarini-Robertson, 1961). Auf der Suche nach einem *eigenständigen Arterienwandstoffwechsel* inkubierten Chernick et al. (1959) Rattenaorten für 3 h in gepufferter Ringerlösung und zeigten den Einbau von Acetat und Phosphat. Whereat (1964) fand in atherosklerotischer Intima nach einstündiger Inkubation von Kaninchenaorten in Phosphatpuffer eine gegenüber normaler Intima gesteigerte Fettsäuresynthese aus Acetat. Day und Wahlquist (1968) zeigten, daß bei Inkubation von Kaninchenaorten die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Ölsäure über 4 h linear verlief.

Während tierische Arterien frisch gewonnen wurden und nur die Inkubationsdauer schwankte, konnten Untersuchungen von *menschlichen Arterien* entweder nur an chirurgischem Material, also an frischem Gewebe, oder an bis zu 12 h post mortem entnommenen Arterien durchgeführt werden, so daß erwartungsgemäß unterschiedliche Befunde erhoben wurden (Chobanian und Hollander, 1966; Chobanian und Manzur, 1972; Horsch et al., 1973).

Deterling et al. (1953) fanden, daß 2 h nach dem Tode keine alkalische Phosphataseaktivität mehr nachweisbar war, und daß die Arterienentnahme 4 h post mortem die kritische Grenze für die Lebensfähigkeit des Gewebes in der Kultur war.

Im folgenden haben wir die experimentellen Bedingungen für Gewebekulturen von menschlichen Femoralarterienexplantaten bestimmt, indem wir untersuchten:

1. wie lange nach Eintritt des klinischen Todes eine Arterie entnommen werden kann, ohne in ihrer Stoffwechselaktivität eingeschränkt zu sein,
2. über welche Zeiträume Arterienexplantate bei linearer Stoffwechselaktivität in Kultur gehalten werden können und
3. welche methodischen Bedingungen für eine langfristige Gewebekultur erfüllt sein müssen.

## Material und Methoden

Inkubationsmedien wurden aus Humanserum und Gewebekulturmedium zusammengesetzt. Humanserum wurde von Spendern verschiedener Blutgruppen frisch gewonnen, 30 min nach der Entnahme zentrifugiert, das Serum abgehoben und 60 min bei 56° im Wasserbad erhitzt, um die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase und das Komplementsystem zu inaktivieren. Danach wurde das Serum nochmals zentrifugiert und anschließend über Membranfilter (Sartorius, Göttingen) durch Vorfiltration und nachfolgende Sterilfiltration sterilisiert.

Basales Eagle's Medium (BEM) wurde unter sterilen Bedingungen aus 100 ml gebrauchsfertig bezogenem Konzentrat (Flow Laboratories Ltd.) sowie

20 ml Glutamin-Lösung (1,46%)

50 ml steriler Natriumbicarbonatlösung (2,8%) und

1000 ml sterilem Aqua dest. hergestellt.

Zwei verschiedene Medien wurden benutzt. Das Entnahmemedium, in dem frisch entnommene Arterien transportiert und kurzfristig aufbewahrt wurden und das während der Präparation zum Spülen diente, bestand aus BEM, enthielt einen Anteil von 10% Humanserum und war mit Bicarbonat auf einen pH von 7,4 eingestellt. Das Inkubationsmedium, in dem nachfolgend die Inkubation der Arterienexplantate durchgeführt wurde, bestand aus BEM und enthielt einen Anteil von 30% Humanserum. Der pH war ebenfalls mit Bicarbonat auf 7,4 eingestellt.

Alle Medien enthielten Penicillin und Streptomycin (je 0,5 mg/100 ml Medium), sowie als Farbindikator, Phenolrot und wurden bei -20° C bis zur Verwendung eingefroren.

Die Gewebekulturen wurden in sterilen Einmalpetrischalen für die Gewebekultur aus Polystyrol (Falcon Plastics Oxnard, Calif., USA) durchgeführt<sup>1</sup>.

Menschliche Femoralarterien wurden unmittelbar postmortal, spätestens 15 min nach klinischem Tod, durch einen Längsschnitt über der Gefäßloge des Oberschenkels bds. freigelegt, in situ stumpf präpariert und möglichst steril entnommen. Patienten mit Diabetes mellitus, Urämie und solche, bei denen eine cytostatische Therapie unmittelbar vorausgegangen war, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Die Arterien wurden nach der Entnahme in ein steriles Entnahmemedium, das auf 37° C vorgewärmt war, gegeben und sofort weiter verarbeitet. Nabelschnurarterien wurden ebenfalls unmittelbar post partal gewonnen, aus der Nabelschnur freipräpariert und ebenso wie die Femoralarterien behandelt.

Unter sterilen Bedingungen wurden die Arterien auf ein mit Folien überzogenes Korkbrett, das vorher mit 70%igem Alkohol desinfiziert und mit steriler physiologischer NaCl-Lösung nachgespült worden war, aufgezogen und von anhängendem Fett- und Bindegewebe bis auf die Adventitia freipräpariert. Während der Präparation wurde das Gewebe ständig mit Entnahmemedium feucht gehalten. Auf einem zweiten, ebenso vorbereiteten Korkbrett, auf dem unter der Klarsichtfolie Millimeterpapier aufgespannt war, wurde die Arterie der Länge nach eröffnet, sorgfältig mehrmals gespült und mit sterilen Stecknadeln unter einem Zug, der etwa die Länge der Arterie in situ wieder herstellte, auf der Unterlage fixiert. Unter dem Stereomikroskop (Leitz Elvar, Wetzlar) wurden die vorhandenen Läsionen entsprechend der Einteilung der WHO (1958), dem Schweregrad der Atherosclerose zugeordnet.

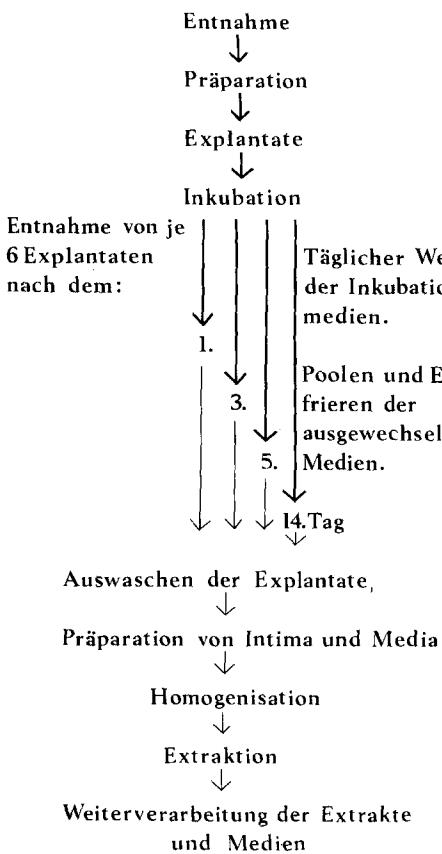
Mit einem sterilen Einmalscalpell wurden 25 mm<sup>2</sup> große Explantate aus dem Arterienstreifen quadratisch ausgeschnitten und sofort in Sammelgefäß mit Inkubationsmedium gegeben. Aus diesen wurden die einzelnen Explantate streng zufällig auf die vorbereiteten Petrischalen zur Gewebekultur verteilt.

Diese Explantate wurden auch für die Gewebekurzkultur von 4–24 h verwendet. Für Gewebekurzkulturen mit einer Inkubation von 4 bis höchsten 10 h wurden die Arterienstreifen in 10 × 20 mm große Segmente aufgeteilt.

*Inkubation.* Vor Beginn der Gewebekultur wurde in jede Petrischale genau 1 ml des auf 37° C vorgewärmten Inkubationsmediums einpippettiert und dann je ein Explantat mit der Intimafläche nach unten eingelegt. Eine Kontrolle ohne Explantate sowie mit einem gekochten Explantat wurde für jeden Versuchsansatz mitgeführt. Die Inkubation der langfristigen Kulturen erfolgte in einem Wassermantelinkubator (Labotect, Göttingen) mit einer CO<sub>2</sub>-Begasung von 4% bei 37° C. Die Gewebekultur konnte in der Regel 90 min nach klinischem Tod des Arterienspenders oder nach Gewinnung der Nabelschnur begonnen werden. Die Medien wurden nach genau 24 h ausgewechselt, individuell gepoolt und eingefroren. An jedem Tag wurden bakteriologische Sterilitätskontrollen auf Blutagarplatten durchgeführt. Als orientierende Kontrolle für die Lebensfähigkeit des Gewebes während der Kultur wurde die pH-Verschiebung, angezeigt durch einen Farbumschlag des Indikators von lachsrot nach blaßgelb, angesehen.

Die Versuchsanordnung geht aus Abbildung 1 hervor: Nach dem 1., 3., 5. und 14. Tag wurde jeweils ein bestimmter Teil der Explantate aus der Kultur entnommen, sorgfältig gewaschen und auf ein Korkbrett gespannt. Unter dem Stereomikroskop wurden die Intima und Teile der Media

<sup>1</sup> Die Abmessungen der Petrischalen betragen 60 × 15 mm mit einem Einsatz für die Gewebekultur von 1,5 ml Fassungsvermögen



**Abb. 1.** Gewebekultur menschlicher Femoralarterienexplantate

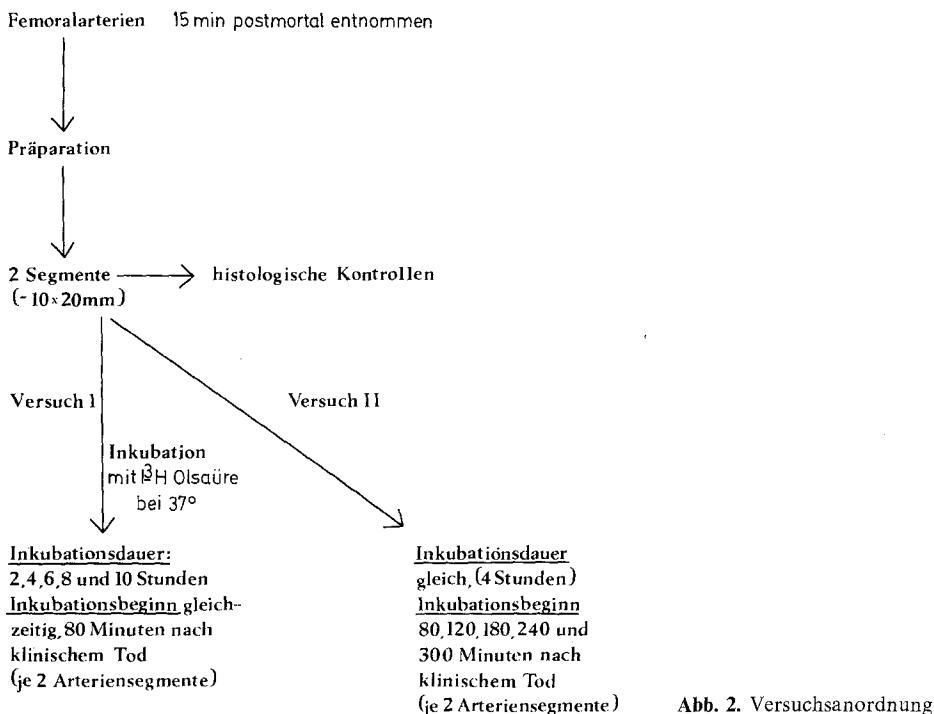
abpräpariert, im Mörser mit etwas Sand homogenisiert und das Homogenat in einem Überschuß von Chloroform/Methanol (2:1/v:v) extrahiert. In bestimmten Fällen wurden alle Explantate in den ersten 24 h mit Isotopen (s.u.) inkubiert.

Die Anordnung der *Gewebekurzkulturen* geht aus Abbildung 2 hervor. Im *Versuchsanansatz I* erfolgte die Inkubation bei gleichzeitigem Beginn sofort nach Entnahme und Präparation der Arteriensegmente über 2, 4, 6, 8 und 10 h.

Im *Versuchsanansatz II* wurden die Arteriensegmente bei Raumtemperatur in physiologische NaCl-Lösung gegeben und 80, 120, 180, 240 und 300 min nach klinischem Tod des Arterienspenders für jeweils 4 h bei 37° C im Schüttelwasserbad mit  $^3\text{H}$ -Ölsäure in 5 ml Medium inkubiert. Die in 1/20n NaOH aufgenommene  $^3\text{H}$ -Ölsäure (2000 mCi mmol, Radiochemical Center, Amersham, England) wurde für einige Minuten auf 60° C erhitzt und dem Inkubationsmedium unmittelbar vor Inkubationsbeginn zugegeben.

In einem dritten, auf der Abbildung nicht dargestellten Versuchsanansatz wurden Explantate wie für die langfristige Gewebekultur gewonnen, aber nur 4–24 h mit  $^3\text{H}$ -Ölsäure inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Arteriensegmente bzw. Explantate in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, Intima und Media wie oben beschrieben gewonnen und weiter verarbeitet. Die Extrakte wurden nach 12 h zentrifugiert (10 min bei 4500 × g), der Überstand abgehoben und das Sediment noch dreimal in Chloroform/Methanol (CM) resuspendiert, zentrifugiert und die Überstände jeweils dem ersten Überstand zugegeben. Der so erhaltene Lipidextrakt wurde gereinigt (Folch et al., 1957) und in Meßkolben auf ein Volumen von 25 ml eingestellt.



Das verbleibende Sediment wurde nach Lufttrocknung mit 1 n NaOH extrahiert und der Protein gehalt mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz in der Modifikation nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Der Glukosegehalt im Inkubationsmedium wurde enzymatisch ermittelt (Boehringer, Mannheim). Die Glukoseaufnahme in 24 h ergab sich aus der Differenz des Glukosegehalts im Ausgangsmedium und im Medium nach 24stündiger Inkubation. Diese Differenz wurde von Tag zu Tag addiert und ergab die kumulative Glukoseaufnahme.

Die Lactatbestimmung erfolgte ebenfalls enzymatisch (Boehringer, Mannheim), wurde für jedes Explantat von Tag zu Tag bestimmt und die kumulative Lactatbildung wie die Glucoseaufnahme ermittelt.

**Dünnenschichtchromatographie.** Ein bestimmtes Volumen des Lipidextraktes wurde unter Stickstoffstrom zur Trockene eingeengt, in 250 µl CM aufgenommen und hiervom je 100 µl mit einer Mikroliterspritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) im Doppelansatz auf eine Kieselgelplatte (DC-Fertigplatten, Merck, Darmstadt) punktförmig unter Stickstoffstrom aufgetragen. Vor der Auftrennung der Neutralfette in Phospholipide, Cholesterin, freie Fettsäuren, Triglyceride und Cholesterinester wurde ein Neutralfettstandard als Träger und „interner Standard“ zugegeben (je 100 µg Lecithin, Cholesterin, Ölsäure, Tripalmitin- und Cholesterinoleat in 25 µl CM, Applied Science, Penn., USA). Die Auftrennung erfolgte mit einem Fließmittelgemisch aus *n*-Hexan: Äther: Essigsäure im Verhältnis 112:38:3. Die einzelnen Lipidbanden wurden unter ultraviolettem Licht mit Hilfe von aufgesprühtem 0,2%igem Dichlorfluoreszein in alkoholischer Lösung nachgewiesen. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Packard Tricarb 3380) nach der Methode von Snyder (1964), entweder nach Einengung aliquoter Mengen der Lipidextrakte unter dem Stickstoffstrom oder nach vorangehender, dünnenschichtchromatographischer Auftrennung in einzelne Lipidfraktionen. Die Lipidbanden wurden direkt von der Kieselgelplatte in Zählrohrchen gekratzt und nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit gezählt.

## Ergebnisse

Die Herkunft der Arteriensegmente und der Arterienexplantate geht aus Tabelle 1 hervor.

Es wurden 2 Nabelschnurarterien und 8 Femoralarterien untersucht, bei allen Femoralarterien fanden sich überwiegend fortgeschrittene atherosclerotische Läsionen (Stadium II und III WHO) neben makroskopisch unauffälligen Bezirken. Durch Randomisierung und streng zufällige Zuteilung der Arteriensegmente bzw. Explantate auf die einzelnen Versuchsansätze wurde eine möglichst gleichmäßige Verteilung des durch den unterschiedlichen atherosclerotischen Befall bedingten Versuchsfehlers angestrebt.

**Gewebekurzkulturen.** Die in vitro-Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Ölsäure durch Arteriensegmente bezogen auf den Proteingehalt von Intima und Media und die im Inkubationsmedium angebotene Aktivität bei gleicher Inkubationsdauer von jeweils 4 h und verschiedenem postmortalem Inkubationsbeginn ist in Abbildung 3 dargestellt. Der Ölsäureneinbau in Segmente derselben Arterie nimmt ab, je größer der Abstand zwischen Inkubationsbeginn und Arterienentnahme wird.

Aus Abbildung 4 geht hervor, daß bei gleichzeitigem Inkubationsbeginn und verschiedener Inkubationsdauer der Ölsäureneinbau bis zu 6 h fast linear ansteigt und danach abfällt. Im Gegensatz dazu verläuft der Ölsäureneinbau in Explantate bei gleichem Inkubationsbeginn und verschieden langer Inkubationszeit in dem Zeitraum von 4–24 h linear (Abb. 5). Diesem linearen Aktivitätseinbau entspricht auch die Glucoseaufnahme und die Lactatbildung in dem Zeitraum von 4–24 h. Die Abbildung 6 zeigt, daß sowohl die Glucoseaufnahme als auch die Lactatbildung kontinuierlich ansteigen.

**Langfristige Gewebekulturen.** Die Lebensfähigkeit der Explantate, die grob orientierend an dem Farbumschlag des Mediums während der Kultur beurteilt worden war, wurde durch die Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentration in jedem Medium nach jeweils 24stündiger Inkubation für alle Explantate individuell überprüft. Glucoseaufnahme und Lactatbildung, bezogen auf den Proteingehalt von Intima und Media der Explantate gehen aus der Abbildung 7 hervor.

**Tabelle 1.** Herkunft und Charakterisierung der untersuchten Arterien

Arterie Nr.	Geschlecht	Alter	Todesursache	Atherosklerosestadium (WHO)
1	Nabelschnurarterie			0
2	Nabelschnurarterie			0
3	♀	63	Thrombopenie	II – III
4	♂	45	Carotisverschluß	I – II
5	♂	79	Apopl. Insult	III
6	♂	83	Apopl. Insult	III
7	♀	55	Myokardinfarkt	I – II
8	♂	53	Myokardinfarkt	III
9	♀	76	Stammhirninfarkt	III
10	♂	41	Leberzirrhose	I

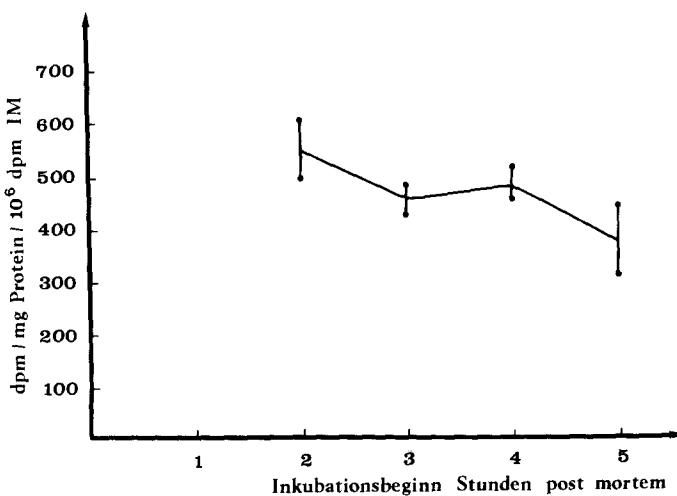


Abb. 3. Einbau von  $^3\text{H}$ -Ölsäure in Lipide menschlicher Femoralarteriensegmente bei gleicher Inkubationsdauer und verschiedenem Inkubationsbeginn nach Entnahme ( $n=8$ , MW  $\pm$  SA)

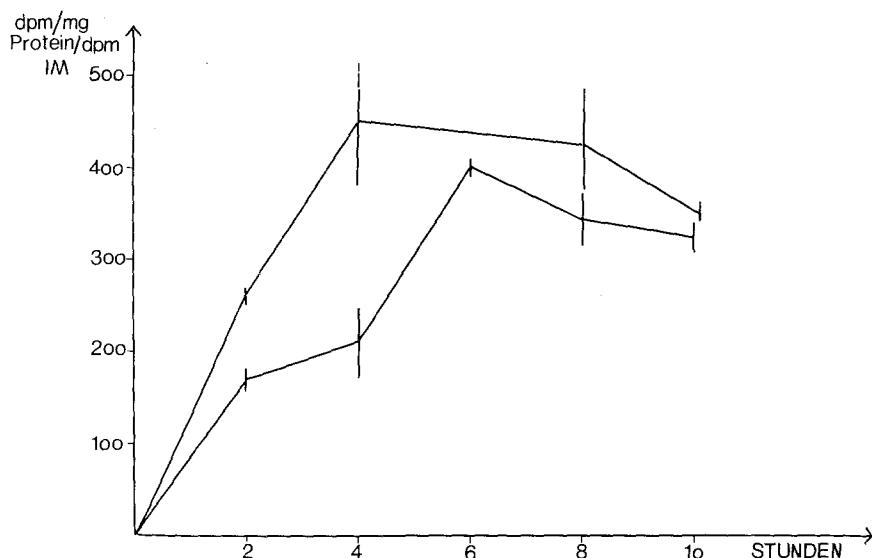
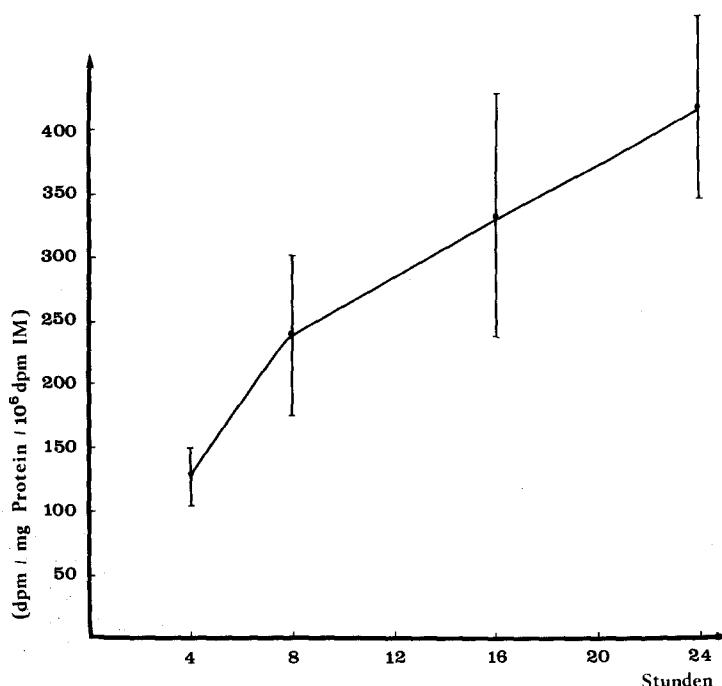


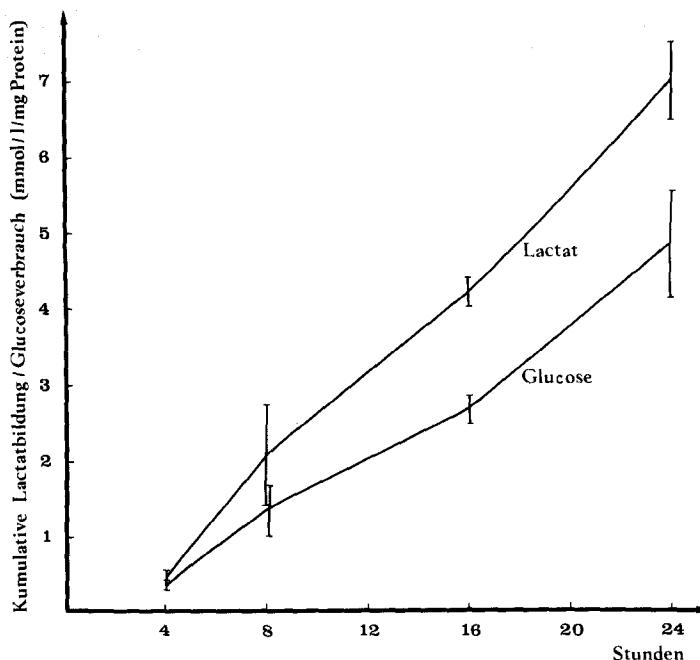
Abb. 4. In vitro-Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Ölsäure durch menschliche Femoralarterien bei gleichzeitigem Inkubationsbeginn und verschiedener Inkubationsdauer ( $n=18$ , MW  $\pm$  SA)

Es ist ersichtlich, daß die Glucoseaufnahme und die Lactatbildung dieser überwiegend aus fortgeschrittenen Läsionen bestehenden Explantate bis zum 14. Tag linear verläuft.

Bei Explantaten, die neben makroskopisch normalen Bezirken vorwiegend frühe Läsionen enthielten, waren Glucoseaufnahme und Lactatbildung wesent-



**Abb. 5.** Einbau von  ${}^3\text{H}$ -Ölsäure in Lipide menschlicher Femoralarterien – fortgeschrittene Läsionen – bei gleichzeitigem Inkubationsbeginn und verschiedener Inkubationsdauer ( $n=16$ , MW  $\pm$  SA)



**Abb. 6.** Glucoseaufnahme und Lactatabbildung durch menschliche Femoralarterien – fortgeschrittene Läsionen – bei gleichzeitigem Inkubationsbeginn und verschiedener Inkubationsdauer ( $n=16$ , MW  $\pm$  SA)

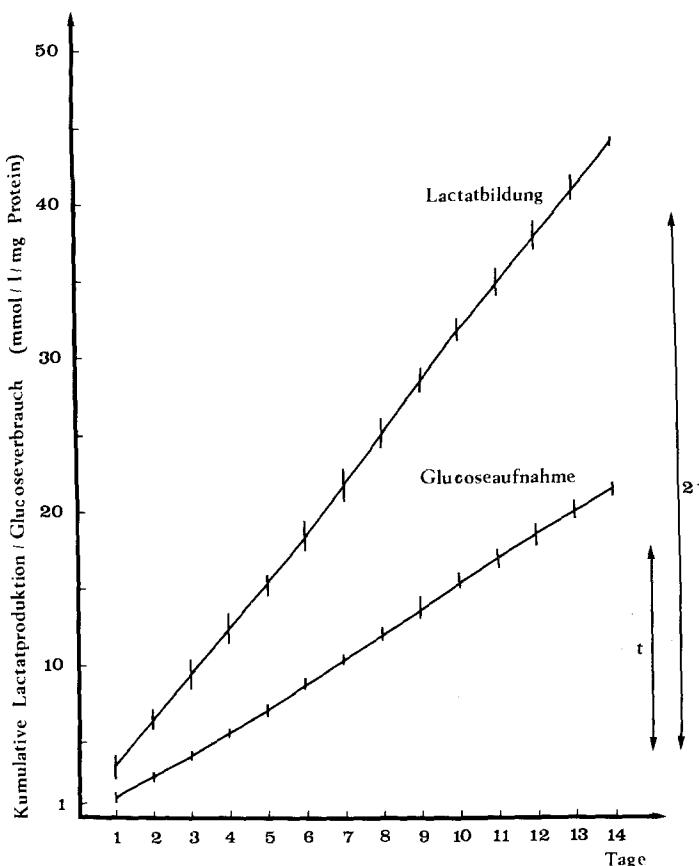


Abb. 7. Glucoseaufnahme und Lactatbildung menschlicher Femoralarterienexplantate in der Gewebekultur ( $n=496$ , MI  $\pm$  SA)

lich höher (Abb. 8). Nach 7 Tagen hatten diese Explantate ebenso viel Glucose verbraucht wie die überwiegend aus fortgeschrittenen Läsionen bestehenden Explantate in 14 Tagen. Demgegenüber sind Glucoseaufnahme und Lactatproduktion bei Nabelschnurartern deutlich geringer (Abb. 9). Bei allen untersuchten Nabelschnurartern fiel ein deutlicher Anstieg der Lactatproduktion vom 10. Tag bei gleichbleibender Glucoseaufnahme auf.

Bei allen mitgeföhrten Kontrollen — Inkubation ohne Explantate, Inkubation von gekochten Explantaten — kam es zu keiner Änderung der Glucose- und Lactatkonzentration im Medium. Eine Kontamination der Medien trat nur anfänglich bei Vorversuchen auf, nach strenger Einhaltung steriler Versuchsbedingungen blieben alle Kulturen steril.

Die Abbildung 10 zeigt die Auswirkung einer bakteriellen Kontamination auf die Glucosekonzentration im Inkubationsmedium; gleichzeitig mit dem Bakteriennachweis steigt die Glucoseverbrauch an.

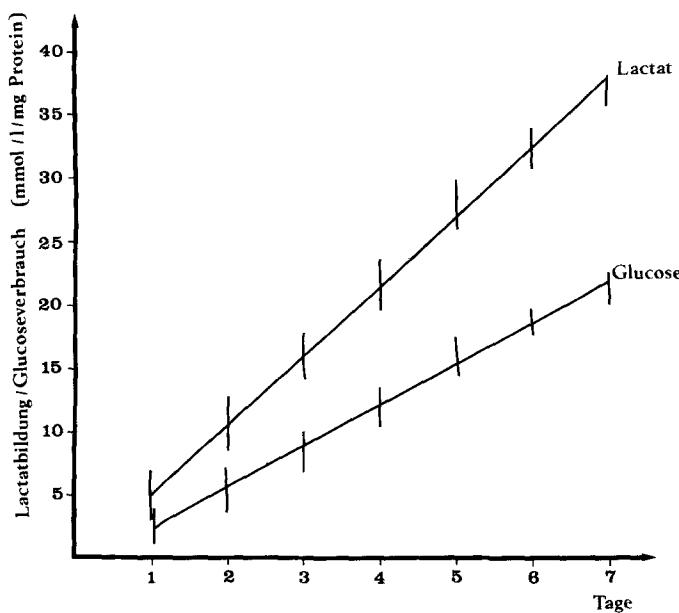


Abb. 8. Glucoseaufnahme und Lactatbildung atherosclerotischer – frühe Läsionen – menschlicher Femoralarterienexplantate ( $n=105$ , MW  $\pm$  SA)

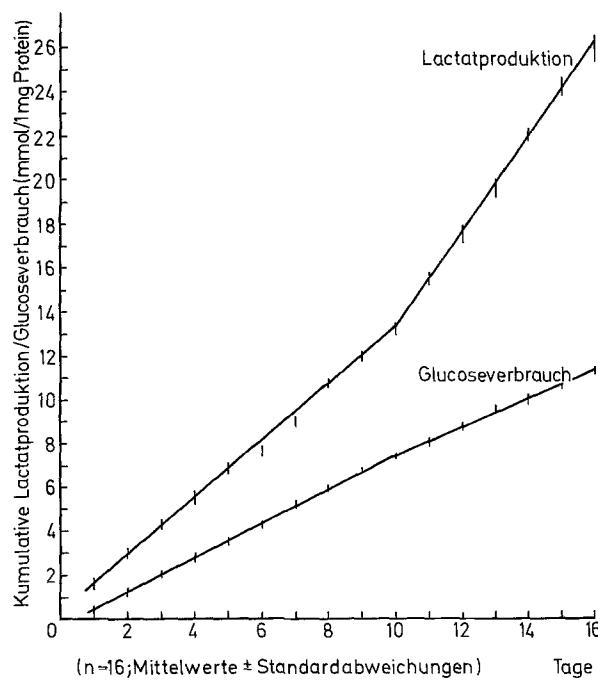


Abb. 9. Glucoseaufnahme und Lactatbildung menschlicher Nabelschnurarterienexplantate

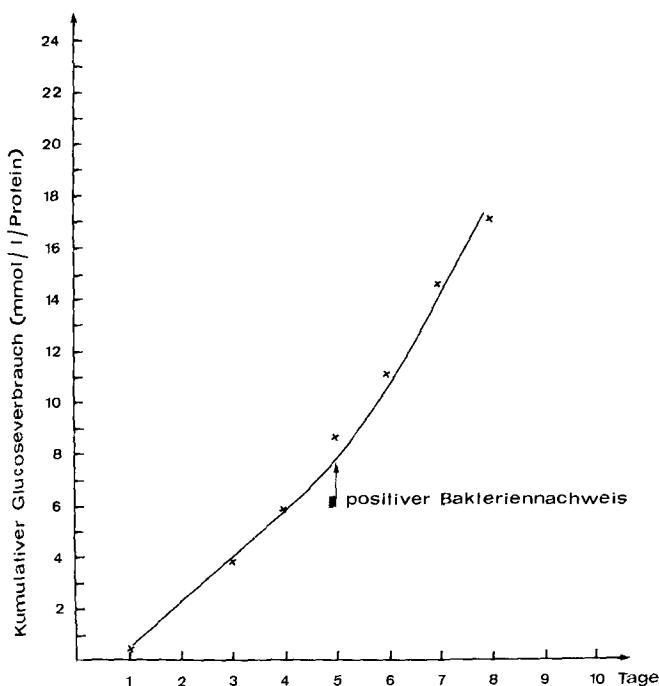


Abb. 10. Glucoseaufnahme atherosclerotischer menschlicher Femoralarterienexplantate bei bakteriel-ler Verunreinigung

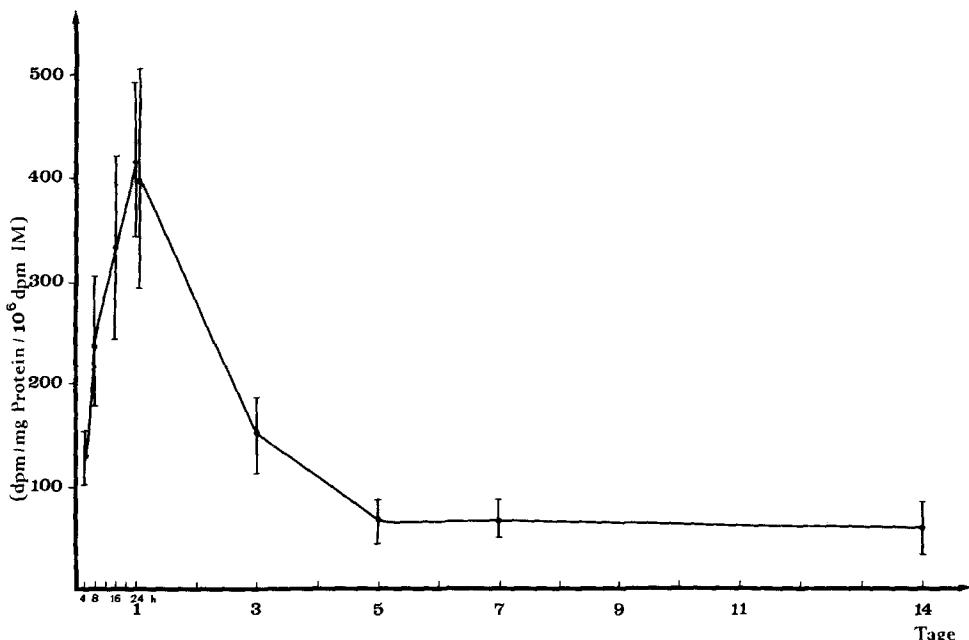


Abb. 11. Einbau und Umsatz von  $^{3}\text{H}$ -Ölsäure in Lipiden menschlicher Femoralarterienexplantate – fortgeschrittene Läsionen – in der Gewebekultur ( $n=37$ , MW  $\pm$  SA)

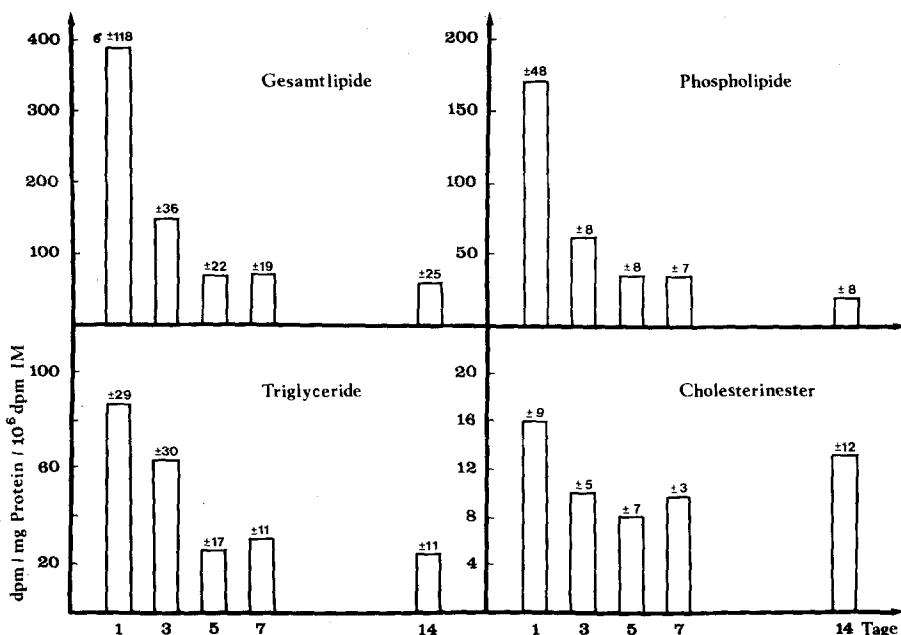


Abb. 12. Einbau und Umsatz von  $^{3}\text{H}$ -Ölsäure in menschlichen Femoralarterienexplantaten (fortgeschrittene Läsionen,  $n=21$ , MW  $\pm$  SA)

Der Einbau und nachfolgende Umsatz von  $^{3}\text{H}$ -Ölsäure in Lipiden der Femoralarterienexplantate ist in Abbildung 11 dargestellt. Nach einem linear ansteigenden Einbau des Isotops bis zu 24 h fällt erwartungsgemäß die Aktivität zwischen dem 1. und 14. Tag kontinuierlich wieder ab, wobei sich vom 5. Tag an ein Plateau ausbildet. Die an den Versuchstagen 3–14 in den gepoolten Inkubationsmedien und in den Lipiden der Explantate nachgewiesene Aktivität entsprach jener, die nach 24ständiger Inkubation vom Gewebe aufgenommen worden war. Der Einbau des Isotops in die einzelnen Lipide geht aus Abbildung 12 hervor. Der höchste Einbau findet sich in die Phospholipide, der geringste in die Cholesterinester. Aber während die Aktivität in den Phospholipiden kontinuierlich abnimmt, steigt sie in den Cholesterinestern allmählich an, als Ausdruck einer fortwährenden intramuralen Cholesterinveresterung.

## Diskussion

Gegenüber der Zellkultur hat die Gewebekultur den Vorzug, eine Funktionseinheit, beispielsweise die der Arterienwand, darzustellen und bietet die Möglichkeit, an genetisch identischem Material gleichzeitig den Stoffwechsel normaler und benachbarter atherosklerotischer Intimabezirke untersuchen zu können (Horsch et al., 1973). Daß nicht alle Elemente dieser Funktionseinheit – der Perfusionsdruck mit unterschiedlicher Dehnung des Gewebes oder humorale Faktoren, um nur einige zu nennen – miteinbezogen werden können, ist ein

Nachteil dieser in-vitro-Methode, der in Kauf genommen werden muß. Von entscheidender Bedeutung für die Lebensfähigkeit der Explantate ist die unmittelbar postmortale Entnahme und sofortige Inkubation des Gewebes. Der Einbau von  $^3\text{H}$ -Ölsäure in die Lipide der Arterienwand fällt bei gleicher Inkubationsdauer und einem Inkubationsbeginn von 2–5 h post mortem kontinuierlich ab, d.h. die Stoffwechselaktivität des Gewebes nimmt mit zunehmendem Abstand zwischen Arterienentnahme und Inkubationsbeginn ab. Diese Befunde bestätigen die Untersuchungen von Deterling et al. (1953), stehen zu jenen aber insofern in Widerspruch, als hier auch nach 5 h post mortem noch ein beträchtlicher  $^3\text{H}$ -Ölsäureeinbau in das Gewebe gefunden wurde.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen stieg mit zunehmender Inkubationsdauer der  $^3\text{H}$ -Ölsäureeinbau bis zu 6 h an, danach fiel die Stoffwechselaktivität des Gewebes allmählich wieder ab. Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden, die an Kaninchenarterien erhoben wurden, überein: Innerhalb einer Inkubationsdauer von bis zu 6 h war ein intakter Arterienwandstoffwechsel gefunden worden (Newman et al., 1966; Hudson, 1975).

Die Größe der in Kultur gebrachten Gewebestücke scheint ein entscheidender Faktor für die Stoffwechselaktivität des Gewebes zu sein: Während der Einbau des Isotops in die  $10 \times 20 großen Arteriensegmente nur bis zu 6 h linear anstieg, war bei  $5 \times 5$  mm großen Arterienstücken der Einbau bis zu 24 h linear. Diese Explantatgröße war in Vorversuchen ermittelt worden. Bei zu kleinen Explantaten waren Glucoseaufnahme und Lactatbildung so gering, daß die Bestimmung methodische Schwierigkeiten bereitete und daher die Lebensfähigkeit des Gewebes nicht zweifelsfrei beurteilt werden konnte. Bei Überschreiten einer gewissen Explantatgröße kam es zu einer starken Ansäuerung des Gewebes mit einem ph-Absfall unter 7,0. Bei dem vorgegebenen Volumen des Inkubationsmediums wurde die Größe der Explantate bestimmt durch die Inkubationsdauer bzw. die jeweilige Kulturdauer zwischen zwei Medienwechsel und methodischen Gesichtspunkten: Explantate mit einer Fläche von  $25 \text{ mm}^2$  hatten ein Naßgewicht von  $20,0 \pm 2,0$  mg und konnten mit der Intimafläche nach unten schwebend in Kultur gehalten werden ohne den Boden zu berühren, so daß auf ein rostfreies Stahlgitter, wie es St. Clair und Lofland (1971) benutzten, die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen 25 mg schwere Taubenaortenexplantate inkubierten, verzichtet werden konnte.$

Daß bei dieser Explantatgröße ein intakter Stoffwechsel über 24 h in demselben Inkubationsmedium gewährleistet ist, geht aus den Glucose- und Lactatbestimmungen zu verschiedenen Zeitpunkten hervor; der Stoffwechsel verläuft in diesem Zeitraum gleichförmig. Ähnliche Befunde wurden an Explantaten von normalen und atherosclerotischen Kaninchenaorten erhoben (Hudson, 1975; Horsch et al., 1977).

Jarmolych et al. (1968) hielten  $1 \text{ mm}^2$  große Explantate von Schweineaorta bis zu 21 Tagen in Kultur und fanden eine ausgeprägte, randständige Fibroblastenproliferation. Unter gleichen Bedingungen wurde dieses periphere Wachstum ab dem 4. Tag der Kultur bei fast gleichzeitigem Auftreten von Zellnekrosen auch von Dauod et al. (1973) beobachtet.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Explantate am Ende dieser Gewebekulturen ergab, daß eine Fibroblastenproliferation nicht stattgefunden hatte.

Auch bei Tauben- und Kaninchenaortenexplantaten war unter vergleichbaren Bedingungen kein peripheres Wachstum gesehen worden (St. Clair und Lofland, 1971; Hudson, 1975; Horsch et al., 1977).

Das Ausbleiben der peripheren Fibroblastenproliferation ist wahrscheinlich damit zu erklären, daß die Explantate ohne Wand- oder Bodenkontakt frei im Medium schweben und daß das Gewebe bis auf die Schnittkanten völlig intakt blieb. Die gesamte Wandstruktur war erhalten und bei der Präparation wurde eine Verletzung der Intima sorgfältig vermieden. Diese Annahme wird gestützt durch die für jedes Explantat über den Kulturzeitraum konstante Glucoseaufnahme. Bis zu 14 Tagen befanden sich die Explantate in einem gleichbleibend biochemisch aktiven Zustand. Daß hierbei der Zahl der Zellen die entscheidende Bedeutung zukommt, geht aus dem unterschiedlichen Glucoseverbrauch von Nabelschnurarterien, Fettstreifen und fortgeschrittenen Läsionen hervor: Glucoseverbrauch und Lactatbildung sind in den zellreichen Fettstreifen am höchsten, in den zellarmen Nabelschnurarterien am geringsten. Dies entspricht auch dem erhöhten Sauerstoffbedarf des atherosclerotischen Gewebes, ohne allerdings mit einer erhöhten oxydativen Phosphorylierung einherzugehen (Wheatley, 1966).

Von in vivo- und in vitro-Untersuchungen ist bekannt, daß der Ölsäureneinbau in die intramuralen Lipide eine Stoffwechselleistung der Arterienwand darstellt (Day, 1974). Der  $^3\text{H}$ -Ölsäureneinbau in das Gewebe stieg über 24 h linear an und in der „kalten“ Inkubationsphase des Gewebes wurde das Isotop und vor allem mit dem Isotop markierte Phospholipide, Triglyceride und Cholesterinester aus dem Gewebe wieder abgegeben und konnten im Inkubationsmedium nachgewiesen werden. Auch am 14. Tag der Gewebekultur waren markierte Lipide im Inkubationsmedium als Zeichen eines aktiven Arterienwandstoffwechsels nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Kaninchenaortenexplantaten bei bis zu 9 Tage dauernder Gewebekultur erhalten (Hudson, 1975).

Die pathogenetischen Vorstellungen von der Atherosclerose wurden vorwiegend an Tiermodellen entwickelt und durch klinische, morphologische und epidemiologische Studien ergänzt. Einzelne Fragestellungen wurden an Gewebekurzkulturen oder an Zellkulturen untersucht, aber langfristige Kulturen menschlicher Arterienexplantate sind bislang nicht durchgeführt worden, so daß mit dieser Methode Aufschlüsse über noch unklare pathogenetische Zusammenhänge erwartet werden dürfen.

Die Verfasser danken Frl. U. Hübsch für zuverlässige technische Hilfe.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des SFB 90 „Cardiovasculäres System“.

## Literatur

- Carrel, A., Burrows, M.T.: Cultivation of adult tissues and organs outside the body. J. Amer. Med. Ass. **55**, 1379–1381 (1910)
- Chernick, S., Srere, P.A., Chaikoff, I.L.: The metabolism of arterial tissue. II. Lipidsynthesis: The formation in vitro of fatty acids and phospholipids by rat artery with  $^{14}\text{C}$  and  $^{32}\text{P}$  as indicators. J. Biol. Chem. **179**, 113–118 (1949)
- Chobanian, A.V., Hollander, W.: Phospholipid synthesis in the human arterial intima. J. Clin. Invest. **45**, 932–938 (1966)

- Chobanian, A.V., Manzur, F.: Metabolism of lipid in the human fatty streak lesion. *J. Lipid. Res.* **13**, 201–206 (1972)
- Daoud, A.S., Fritz, K.E., Jarmolych, J., Augustyn, J.M.: Use of aortic medial explants in the study of atherosclerosis. *Exp. Mol. Pathol.* **18**, 177–189 (1973)
- Day, A.J.: "Arterial wall metabolism and plasma lipids in atherogenesis". In: International Encyclopedia of pharmacology and therapeutic pharmacology of lipid transport and atherosclerotic process, pp. 485–533. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig: Pergamon Press 1974
- Day, A.J.: Lipid metabolism by rabbit aortic intimal and medial cells in tissue culture. *Virchows Arch. Path. Anat.* **362**, 89–105 (1974)
- Day, A.J., Wahlquist, M.L.: The uptake and metabolism of  $^{14}\text{C}$  labelled oleic acid by atherosclerotic lesion in rabbit aorta. A biochemical and radioautographic study. *Circ. Res.* **23**, 779–788 (1968)
- Deterling, R.A., Jr., Parshley, M.S., Blunt, J.W.: A critical study of present criteria governing selection and use of blood vessel graft. *Surgery* **33**, 215–232 (1953)
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509 (1957)
- Horsch, A.K., Day, A.J., Sanwald, R.: Lipidstoffwechsel normaler und atherosklerotisch veränderter Intima in menschlichen Femoralarterien. *Virchows Archiv Abt. A Path. Anat.* **361**, 71–75 (1973)
- Horsch, A.K., Hudson, K., Day, A.J.: Uptake and metabolism of  $^3\text{H}$ -fatty acid labelled lecithin by normal and atherosclerotic intima in vivo and in vitro. *Atherosclerosis* **26**, 493–504 (1977)
- Hudson, K.: Metabolism of phospholipids by organ cultures of rabbit aorta. These, Universität Melbourne, Australien (1975)
- Jarmolych, J., Daoud, A.S., Landau, J., Fritz, K.E., McElvane, E.: Aortic media explants. Cell proliferation and production of mucopolysaccharides, collagen, and elastic tissue. *Exp. Molec. Pathol.* **9**, 171–188 (1968)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951)
- Lazzarini-Robertson, A.: Effects of heparin on the uptake of lipids by isolated human and animal endothelial type cells. *Angiology (Baltimore)* **12**, 525–534 (1961)
- Newman, H.A.I., Day, A.J., Zilversmit, D.B.: In vitro phospholipid synthesis in normal and atherosomatous rabbit aortas. *Circ. Res.* **19**, 132–138 (1966)
- St. Clair, R.W., Lofland, H.B.: Uptake and esterification of exogenous cholesterol by organ cultures of normal and atherosclerotic pigeon aorta. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* **138**, 632–637 (1971)
- Simms, H.S., Harmison, C.R., Best, R.G.: Cholesterol and anti lipofanogen in arteriosclerosis. *J. Geront.* **9**, 133–141 (1954)
- Snyder, F.: Radioassay of thin layer chromatograms. A high resolution zonal scraper for quantitative  $\text{C}^{14}$  and  $\text{H}^3$  scanning of thin layer chromatograms. *Analyt. Biochem.* **9**, 183–196 (1964)
- Whereat, A.F.: Lipid biosynthesis in aortic intima from normal and cholesterol fed rabbits. *J. Atheroscler. Res.* **4**, 272–282 (1964)
- Whereat, A.F.: Fatty acid synthesis in cell free system from rabbit aorta. *J. Lipid. Res.* **7**, 671–677 (1966)
- World Health Organization (WHO) 1958: Technical report series No. 143

Eingegangen am 1. März 1977