

3. Implantation von Endothelzellbeschichteten Herzklappen im Schafmodell

Nachdem Tierversuche im Modell „juveniles Schaf“, etabliert und standardisiert waren, wurden die mit Methoden des Tissue Engineering hergestellten Herzklappen in präklinischen in-vivo Studien untersucht. Venensegmente neugeborener Schafe wurden entnommen, um wie im vorherigen Kapitel beschrieben (*Veröffentlichung 2.2*) daraus Zellen zu isolieren, charakterisieren und zu expandieren. In diesen Tierstudien war nachzuweisen, dass die Endothelzellen nach der in vitro Beschichtung ausreichend auf den Klappen haften und nicht durch dem Blutfluss weggeschwemmt werden. Weiterhin war zu zeigen, dass das Gerüst der Herzklappe unter Dauerbelastung ausreichende Stabilität aufweist. Dabei ist die Regeneration des Klappengerüsts durch autologe interstitielle Zellen wichtig und muss in ihren Teilschritten sequentiell erforscht werden.

In einer ersten Studie wurde diese neuartigen Herzklappen implantiert, um hämodynamische Daten nach drei und sechs Monaten zu erhalten. Nachdem die hämodynamischen Daten gesichert waren, wurden die Tiere getötet, um so die Implantate histologisch aufzuarbeiten. Es konnte gezeigt werden, dass die neue Herzklappe einer Dauerbeanspruchung standhält. In vitro wäre dieser Nachweis nicht möglich gewesen, da das Implantat nicht aus fixiertem Gewebe besteht. Außerdem wurde durch diese Untersuchung die Persistenz eines konfluierenden Endothels nachgewiesen. Klappendegeneration im Sinne von Verkalkungen konnte nicht festgestellt werden. Es zeigte sich, dass neben erhaltener mechanischer Festigkeit unter physiologischer hämodynamischer Belastung auch die zellulären Komponenten der Herzklappe erhalten und in Sinne einer physiologischen Rezellularisierung vervollständigt werden (*Veröffentlichung 3.1.*).

Anschließend wurde untersucht, ob durch Anwendung von Techniken des Tissue Engineering, die Herzklappendegeneration, insbesondere der Herzklappensegel, verringert oder sogar ausgeschlossen werden kann. Um dieses nachzuweisen wurden drei und sechs Monate nach Implantation, Untersuchungsmethoden, wie Röntgenuntersuchung, Histologie und Atomabsorptionsspektrometrie eingesetzt. Im juvenilen Schaf sind drei und sechs Monate standardisierte Zeiten für die Untersuchung von Herzklappen, die eine hohe

Aussagekraft in Hinblick auf langfristige Veränderungen im Patienten besitzen
(*Veröffentlichung 3.2*).

3.1. *Dohmen PM, Ozaki S, Yperman J, Flameng W, Konertz W. Results of Tissue engineered auto-xenograft implanted in the juvenile sheep model. Med Sci Monit 2003;9:BR97-BR104.*

Diese Arbeit gibt eine Übersicht über die Wirkweise dieser neuartigen, in vitro mit autologen Endothelzellen besiedelten Herzklappe. Acht Schafen wurden Venensegmente entnommen. Im Zellzuchtlabor wurde die Endothelzellen isoliert und vermehrt. Nachdem eine ausreichende Anzahl von Zellen verfügbar war, wurden zuvor dezellularisierte Herzklappen vom Schwein damit beschichtet. Diese autolog besiedelten Herzklappen wurden beim Schaf implantiert und nach sieben Tagen, drei und sechs Monaten funktionell evaluiert. Anschließend wurden die Herzklappen explantiert und makroskopisch begutachtet, um sie dann zu fixieren, zu färben und histologisch zu untersuchen. Weiterhin wurden Herzklappensegmente elektronenmikroskopisch aufgearbeitet um ultrastrukturelle Veränderungen exakt darstellen zu können.

Die Ergebnisse zeigten, dass die in vitro aufgebrauchten Endothelzellen dauerhaft festsitzen und durch den Blutfluss nicht weggeschwemmt werden. Mit der Zeit findet zudem ein Einwachsen von autologen Fibroblasten in das zellfreie Klappengerüst statt. Da die Fibroblasten für den Wiederaufbau der Klappenmatrix zuständig sind, konnte damit ein Regenerationspotential dieser Herzklappe nachgewiesen werden. Die hämodynamische Evaluation zeigte, dass die Herzklappe im Gegensatz zu andern Implantaten keine erhöhten Druckgradienten entwickelte und auch nicht insuffizient wurde.

3.2. *Dohmen PM, Ozaki S, Yperman J, Flameng W, Konertz W. Lack of calcification of tissue engineered auto-xenografts in juvenile sheep. Semin Thorac Cardiovasc Surg 2001;13(Suppl):I 93-I 98.*

In dieser Arbeit wurden bei acht Schafen eventuelle Veränderungen der Herzklappensegel detailliert untersucht und überprüft, ob in einem Zeitraum von drei bis sechs Monaten die Flexibilität der Herzklappensegel erhalten bleibt. Histologisch und atomabsorptionsspektrometrisch wurde die Anwesenheit von Kalzium im Klappensegel untersucht. Um Ausgangswerte über den Kalziumgehalt zu erhalten, wurden auch nicht implantierte, dezellularisierte Herzklappen untersucht.

Im Bereich der Herzklappensegel ließen sich keine Verkalkungen darstellen. Die Atomabsorptionsspektrometrie zeigte über die gesamte Versuchsdauer keine signifikanten Veränderungen der Kalziumkonzentration im Gewebe.