

5. Diskussion

Die ideale Herzklappenprothese zum Ersatz einer erkrankten Herzklappe gibt es bisher nicht. Mit Hilfe der Technik des Tissue Engineering wurde es möglich, eine Klappe herzustellen die Vorteile gegenüber allen kommerziell erhältlichen Herzklappen bietet. Im Mittelpunkt stand dabei die Entwicklung eines Herzklappengerüsts, das in vitro mit autologen Endothelzellen besiedelt wurde. In vivo müssen dann weitere Zelltypen einwachsen, um die volle Funktionsfähigkeit der Herzklappe zu erreichen.

Um ein geeignetes Herzklappengerüst zu entwickeln gibt es zwei Möglichkeiten. Einerseits gibt es die Möglichkeit ein Herzklappengerüst aus bioabsorbierbaren Polymeren zu fertigen und andererseits gibt es die Möglichkeit eine biologische Matrix menschlichen oder tierischen Ursprungs zu verwenden. Ein geeignetes Herzklappengerüst aus Polymeren zu erstellen ist eine sehr komplexe Aufgabe, da die geometrische Form und die Funktion von Herzklappen in sehr enger, bisher nicht vollständig aufgeklärter Beziehung stehen.

Shinoka und Kollegen zeigten, dass es möglich ist, Herzklappensegel aus Polyglykolsäure anzufertigen (46). Dieses Gerüst zeigte jedoch den Nachteil zu schnell resorbiert zu werden. Die in vitro eingebrachten interstitiellen Zellen hatten nicht die Möglichkeit ein stabiles Gerüst aufzubauen. Somit war dieses Gerüst nicht in der Lage längerfristig physiologischen Belastungen standzuhalten.

Hoerstrup und Kollegen (47) führten eine zusätzliche Beschichtung mit Poly-4-hydrobutyrat durch. Das sollte zu einer höheren Stabilität des Gerüsts führen. Leider zeigte sich auch dieses Gerüst im Tierversuch nicht suffizient. Außerdem sollte festgehalten werden, dass dieses Gerüst nur auf der Basis von Kollagen hergestellt und die wichtige Elastin-Komponente nicht berücksichtigt wurde.

Ein weiterer Ansatz ein Herzklappengerüst herzustellen, dass sich zum Tissue Engineering eignet, ist eine biologische Herzklappe komplett von allen Zellen zu befreien. Ein großer Vorteil dieses Gerüsts ist die Anwesenheit von Kollagen und Elastin. Auch bleiben die komplexen Strukturen, wie Herzklappensegel und Sinus Valsalva erhalten. In früheren Publikationen wurde der wichtige Einfluss dieser Strukturen auf das Schließverhalten von Herzklappen gezeigt (48).

Während der Dezellularisierung müssen wichtige Faktoren berücksichtigt werden. Die Dezellularisierung einer Herzklappe soll für das Herzklappengerüst schonend sein, sodass es seine Stabilität behält. Dieses Herzklappengerüst sollte idealerweise frei von Glutaraldehyd und anderen toxischen Substanzen sein um so später die Lebensfähigkeit der Zellen nicht zu beeinträchtigen.

Andere Forschergruppen dezellarisieren Herzklappengerüste mit Trypsin und EDTA (49). Diese Methode scheint jedoch äußerst aggressiv zu sein. Die Integrität des Herzklappengerüsts wird nicht ausreichend erhalten, die Klappen versagen schon nach Implantation im kleinen Kreislauf (50). Außerdem zeigten sich im juvenilen Schafmodell Verkalkungen der Herzklappenwand und der Herzklappensegel. Dieses kann wahrscheinlich durch Reparaturvorgänge nach zu aggressiver Dezellularisierungsbehandlung erklärt werden (51).

Ein anderes dezellularisiertes Herzklappengerüst, das im klinischen Bereich Anwendung fand, ist der SynergraftTM (52). Diese Herzklappe wird jedoch nicht in vitro mit patienteneigenen Zellen besiedelt. Simon und Kollegen zeigten (53), dass diese Herzklappen, die durch Bestrahlung, Anwendung von Enzymen, Detergentien und Einfrieren dezellularisiert wurden, bereits vor Implantation schwerste Veränderungen aufwiesen. Bei Neugeborenen zeigte diese Herzklappe innerhalb von Tagen progressive Degenerationen.

Das Klappengerüst muss also eine ausreichende mechanische Stärke besitzen, ohne seine elastischen Eigenschaften zu verlieren. Bisher wird das bei Bioprothesen durch die Anwendung von Glutaraldehyd erreicht. Eine Herzklappe tierischen Ursprungs ohne Behandlung mit Glutaraldehyd wird mit Sicherheit eine Abstoßungsreaktion hervorrufen. Außerdem muss die Übertragung von endogenen Retroviren sicher ausgeschlossen sein. Kurihara und Mitarbeiter (54) zeigten in einer Arbeit die Bedeutung, alle porcinen Endothelzellen zu entfernen und so das Risiko auf Null herabzusetzen. Die meisten Veröffentlichungen in diesem Zusammenhang betreffen jedoch Xenotransplantationen solider, vaskularisierter Organe wobei die Empfänger hinterher intensiv immunsuppressiv behandelt werden. Dies ist bei Herzklappenpatienten natürlich nicht der Fall. Magre und Mitarbeiter (55) zeigten in einer Übersichtsarbeit, dass das Risiko der Übertragung von Viren vom Schwein auf dem Menschen generell gering ist, jedoch muss man auf diesem Gebiet der Medizin vorsichtig sein und jede Eventualität ausschließen. Wir konnten zeigen, dass das angewendete Herzklappengerüst frei ist von jeglichen porcinen Zellen und dieses Problem somit nicht relevant ist (56). Bei der Produktion der Herzklappen für die Anwendung am Patienten, wurde immer eine Referenzklappe histologisch und mittels real time PCR aufgearbeitet um zu dokumentieren, dass das verwendete Herzklappengerüst frei von Zellen und Virus-RNA ist.

Nachdem wir eine sicher zellfreie Herzklappenmatrix entwickelt hatten, stellte sich die Frage, ob dieses Herzklappengerüst eine ausreichende Stabilität aufweist. Dieses wurde in vitro im Pulsduplikator unter diversen hämodynamischen Bedingungen ermittelt. Die Veröffentlichung 1.3 zeigt die exzellenten mechanischen und hämodynamischen Eigenschaften dieser Herzklappengerüste.

In einem nächsten Schritt etablierten wir ein geeignetes Tiermodell, um die Eigenschaften und Potentiale dieser Herklappe in vivo zu untersuchen. Aufgrund langjähriger Erfahrung mit dem Modell „juveniles Schaf“ ergab sich die Bevorzugung dieses Modells. Es bot auch die Möglichkeit, die neue Herzklappe mit früher implantierten Herzklappen zu vergleichen. Andere Arbeitsgruppen hatten schon zuvor angedeutet, dass das Schafmodell auch im Bereich des Tissue Engineering durchaus anwendbar ist (57,58,59).

Für eine einwandfreie langfristige Funktion des Herzklappengerüsts ist eine Endothelbesiedlung unter Umständen vorteilhaft. Endothelzellen sind äußerst komplexe Zellen, deren genaue biologische Bedeutung bei Herzklappen im Gegensatz zu Blutgefäßen, nicht vollständig bekannt ist (60).

Bei Herzklappen, die in Glutaraldehyd fixiert worden sind, liegt die Gefahr einer Prothesenendokarditis (61) höher als bei kryokonservierten Allografts. Dieses Risiko wird durch die Anwesenheit von autologen Endothelzellen auf Herzklappen verringert. Die Gefahr der Prothesenendokarditis ist in den ersten 3 Monaten nach der Operation am höchsten (62). Damit geht eine sehr hohe Mortalität, die zwischen 8 und 67% liegt, einher (63,64). Böhm et al konnten in einer klinischen Studie (65) zeigen, dass die Ross Operation bei aktiver Herzklappenendokarditis exzellente Resultate bietet. Dies wird durch die Implantation einer Herzklappe mit lebenden Endothelzellen erklärt. Endothelzellen haben die Möglichkeit Einfluss auf das unterliegende Gewebe des Klappengerüsts zu nehmen. Es ist bekannt, dass Endothelzellen wesentlichen Einfluss und wichtige Signalfunktionen auf Fibroblasten haben (66). In tierexperimentellen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die in vitro Beschichtung mit autologen Endothelzellen eine deutliche Zunahme von Fibroblasten in der Matrix mit sich bringt. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass diese Fibroblasten Prokollagen und Kollagen produzieren (67).

Langfristig zeigten die Klappen keine Verkalkung bei erhaltener Regenerationsfähigkeit und antithrombotischem Potenzial, welches durch die konfluente Endothelzellschicht gewährleistet wurde. Histologisch fand eine Rezellularisierung der Matrix bei erhaltener Endothelzellschicht statt. Nach 7 Tagen waren adhärente Endothelzellen nachzuweisen, was dafür spricht, dass diese Herzklappe eine lebende Struktur ist. Nach 3 Monaten begannen interstitielle Zellen das Herzklappengerüst zu infiltrieren. Somit ist die Möglichkeit einer Regeneration des Herzklappengerüsts gegeben. Histologisch sah man nach 6 Monaten eine normale Zelldichte im Gewebe. In den Herzklappen konnten keine Verkalkungen oder degenerativen Veränderungen nachgewiesen werden. Ozaki et al verglichen diese neuartige Herzklappe mit zwei herkömmlichen, kommerziell erhältlichen Herzklappen, die im gleichen Zeitraum deutlich verkalkten (68).

Nachdem umfangreiche tierexperimentelle Daten zur Verfügung standen, wurden die ersten dezellularisierten Herzklappen klinisch angewendet. Es erschien uns als der kleinere Schritt, zunächst Herzklappen menschliche Ursprungs, sogenannte Allografts, zu dezellularisieren. Oei und Mitarbeiter (69,70) hatten in verschiedene Studien gezeigt, dass Allografts sowohl im Tierexperiment als auch im Patienten deutliche immunologische Reaktionen hervorrufen können. Dies wurde histologisch und immunohistochemisch nachgewiesen. Mitchell und Mitarbeiter (71) konnten nachweisen, dass im Gegensatz zu kryokonservierten Allografts, bei Gabe von Immunsuppressiva bei herztransplantierten Patienten keine immunologischen Reaktionen an den Herzklappen nachgewiesen werden können. Der Einfluss immunologischer Reaktionen auf die Funktionalität von Herzklappen konnte in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen werden.

In der ersten Studie verwendeten wir dezellularisierte Allografts. Während einer Nachbeobachtungszeit von bis zu 3,5 Jahren nahm die Flussgeschwindigkeit im Vergleich zu den bei der Entlassung erhobenen Werten nicht zu. Moidl und Mitarbeiter (72) zeigten dagegen bei ihren Patienten bereits nach einem Jahr eine Zunahme der Flussgeschwindigkeit von mehr als 30% von 1,3 auf 1,8 m/s. Diese Werte werden, obwohl es sich um eine pathologische Druckbelastung handelt, vom rechten Herzen lange Zeit gut vertragen.

Yacoub und Mitarbeiter (73) fanden bei Nachuntersuchungen nach 2 Jahren bei 21% ihrer Patienten eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit auf 3,4 m/s, was deutlich pathologisch ist.

Eigene klinische Studien zeigten, dass diese Veränderungen unterdrückt werden, wenn Allografts von ihren Zellen befreit werden (74,75).

Sievers und Mitarbeiter (52,53) zeigten, dass bei Herzklappen die nach einem anderen Dezellularisationsverfahren hergestellt wurden die Flussgeschwindigkeit postoperativ genauso zunahm wie bei Verwendung regulärer Allografts. Dies könnte damit erklärt werden, dass diese Herzklappen nicht komplett azellulär sind, nicht mit autologen Endothelzellen *in vitro* beschichtet wurden oder dass das verwendete Dezellularisierungsverfahren derart aggressiv ist, dass die Kollagenstrukturen des Herzklappengerüsts verändert werden und damit ein neuer, nicht weniger wichtiger Ansatz für eine Klappendegeneration geboten wird.

Ein wesentlicher Nachteil der Anwendung von Allografts besteht darin, dass diese Herzklappen nur bedingt zur Verfügung stehen und die Nachfrage nicht gedeckt werden kann. Außerdem ist die Aufarbeitung dieser Herzklappen sehr aufwendig und es stehen keine validierten Sterilisationsverfahren zu Verfügung. Die Anzahl der Klappen mit kleinem Durchmesser ist so gering, dass alternative Klappengerüste benötigt werden. Da Schweineherzklappen den menschlichen Herzklappen sehr ähnlich sehen und in Überfluss verfügbar sind, entschieden wir uns für dieses Spezies.

Sowohl im klinischen Verlauf als auch bei den Funktionsparametern konnten bei unseren Patienten nach Verwendung von Herzklappengerüsten menschlichen oder tierischen Ursprungs, keine Unterschiede festgestellt werden.

Aus den Daten und Erfahrungen der vorliegenden Arbeit dürfen folgende Schlussfolgerungen gezogen werden :

- 1) Glutaraldehydfrei hergestellte dezellularisierte Herzklappen können hämodynamisch voll belastet werden, ohne dass diese Herzklappen Insuffizienzzeichen zeigen.
- 2) Diese Herzklappen zeigen bei Langzeitimplantation im Schafmodell keine Verkalkungen oder Degeneration.
- 3) Diese Herzklappen lassen sich mit autologen Endothelzellen beschichten.
- 4) In diese neuartigen Herzklappen wachsen in Langzeitversuchen autologe Fibroblasten und Myofibroblasten ein.
- 5) Dezellularisierte autolog besiedelte Allografts zeigen hämodynamisch ein vollständig unterschiedliches Verhalten als reguläre Allografts.
- 6) Die Hämodynamik ist im Gegensatz zu regulären Allografts über 3,5 Jahre nicht verändert, es zeigen sich über diesen Zeitraum physiologische Funktionswerte im Normalbereich gesunder Probanden.
- 7) Postoperativ zeigten die Patienten bessere Verläufe ohne die bei regulären Allografts häufig zu verzeichnenden Entzündungsreaktionen.
- 8) Klinisch waren mittelfristig Degeneration und Verkalkungen nicht nachweisbar.
- 9) Vollständig dezellularisierte Herzklappengerüste müssen nicht unbedingt allogenen, sondern dürfen xenogen sein.
- 10) Klinisch und hämodynamisch lassen sich autolog besiedelte dezellularisierte Allografts und Xenografts nicht von einander unterscheiden.

Die vorliegende Habilitationsarbeit zeigt einen Ansatz für die Anwendung dieser neuen Generation von Herzklappen. Klinische Langzeitergebnisse werden benötigt, um die Aussagen weiter zu erhärten.

Ausblick:

Unsere Daten zeigen vielversprechende Möglichkeiten für einen neuen Herzklappentyp auf. Weitere experimentelle und klinische Arbeiten müssen jedoch zeigen, ob diese lebende Herzklappe auch Wachstumspotential besitzt. Dies wäre eine wichtige Entwicklung für die Herzchirurgie kongenitaler Vitien, da derzeit keine Herzklappe mit Wachstumspotential verfügbar ist. Ob die in vitro Beschichtung mit Endothelzellen wirklich notwendig ist, muss in weiteren Untersuchungen ebenfalls geklärt werden. Sollte die in vitro-Beschichtung mit Endothelzellen nicht erforderlich sein, würde dies die Anwendung der neuartigen Herzklappen deutlich vereinfachen.