

Aus der Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie
des Deutschen Herzzentrums Berlins

DISSERTATION

**Histologie der dezellularisierten, tissue-engineerten, minimalinvasiv trans-
venös implantierten Pulmonalklappen im Schafsmodell.**

**Histology of the decellularized, tissue-engineered, minimally invasive trans-
venously implanted pulmonary valves in a sheep model.**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Valentin Stegner

aus Ludwigsburg

Datum der Promotion: 30.06.2024

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| <i>Inhaltsverzeichnis</i> | 1 |
| <i>Abkürzungsverzeichnis</i> | 1 |
| <i>Abbildungsverzeichnis</i> | 3 |
| <i>Tabellenverzeichnis</i> | 4 |
| <i>Diagrammverzeichnis</i> | 5 |
| <i>Zusammenfassung der Arbeit</i> | 6 |
| <i>Abstract</i> | 8 |
| 1. Einleitung | 10 |
| 1.1 Einführung | 10 |
| 1.2 Entwicklung des Herzens und der Herzklappen | 11 |
| 1.3 Anatomie und Funktion der Pulmonalklappe | 12 |
| 1.4 Zellulärer Aufbau einer Herzklappe | 13 |
| 1.4.1 Klappenendothel | 13 |
| 1.4.2 Interstitielle Zellen..... | 14 |
| 1.4.3 Extrazelluläre Matrix | 14 |
| 1.4.4 Schichtaufbau der Semilunarklappe | 16 |
| 1.4.5 Schichtaufbau der Arteria pulmonalis | 17 |
| 1.5 Erkrankungen der Herzklappen | 19 |
| 1.5.1 Angeborene Herzklappenfehler | 19 |
| 1.5.2 Erworbene Herzklappen Vitien | 20 |
| 1.6 Ersatzverfahren | 21 |
| 1.6.1 Operative Herzklappenimplantation | 22 |
| 1.6.2 Minimalinvasive Implantationswege..... | 23 |
| 1.7 Tissue Engineering | 24 |
| 1.7.1 Herstellung von tissue-engineerten Herzklappen | 25 |
| 1.7.2 Dezellularisierung von Herzklappen | 26 |
| 1.7.3 Tissue-engineerte Herzklappen in der Forschung | 27 |
| 1.8 Schafsmodell | 28 |
| 2. Methodik | 29 |
| 2.1 Tiere | 29 |
| 2.1.1 Schafsmodell..... | 29 |
| 2.1.2 Genehmigungen (Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo))..... | 29 |
| 2.1.3 Abbruchkriterien..... | 29 |
| 2.2 Ablauf | 30 |
| 2.2.1 Narkose, Monitoring und Euthanasie | 31 |
| 2.2.2 Lagerung und OP-Vorbereitung | 31 |
| 2.2.3 Implantation | 32 |
| 2.2.4 Intrakardiale Echokardiographie (ICE) | 32 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 2.2.5 Computertomographie (CT) | 33 |
| 2.2.7 Angiografie | 33 |
| 2.2.8 Invasive Druckmessung..... | 34 |
| 2.2.9 Explantation..... | 34 |
| 2.3 Verwendetes Material und Geräte..... | 35 |
| 2.3.1 Herzklappen..... | 35 |
| 2.3.1.1 Probenentnahme | 36 |
| 2.3.1.2 Scaffold..... | 36 |
| 2.3.1.3 Stent | 37 |
| 2.3.1.4 Herstellung der Herzklappe | 37 |
| 2.3.1.5 Dezellularisierung..... | 38 |
| 2.3.2 Katheter..... | 38 |
| 2.3.3 Crimping..... | 40 |
| 2.4 Makroskopie..... | 41 |
| 2.5 Histologie | 41 |
| 2.5.1 Schnitte | 41 |
| 2.5.2 Plastic embedding..... | 42 |
| 2.5.3 Färbungen | 43 |
| 2.5.4 Auswertung..... | 44 |
| 2.6 Statistik..... | 45 |
| 2.7 Literaturrecherche | 45 |
| 3. Ergebnisse..... | 46 |
| 3.1 Tiere | 46 |
| 3.2 Implantation..... | 46 |
| 3.2.1 Crimping..... | 50 |
| 3.2.2 Invasive Druckmessung..... | 50 |
| 3.2.3 Kontroll-CT nach Implantation | 51 |
| 3.3. Funktion der Klappen im Follow-Up..... | 52 |
| 3.3.1 Intrakardiale Echokardiographie (ICE) | 52 |
| 3.3.2 Magnetresonanztomographie (MRT) | 55 |
| 3.4 Makroskopie..... | 56 |
| 3.5 Histologie der Klappen..... | 60 |
| 3.5.1 Einwachsen und Position des klappentragenden Stents | 60 |
| 3.5.2 Taschen der dTEHV | 62 |
| 3.5.3 Endothelialisierung und Neointima | 63 |
| 3.5.4 Wiederbesiedlung | 65 |
| 3.5.5 Gewebeumbau | 66 |
| 3.5.6 Verkalkung | 68 |
| 3.5.7 weitere Auffälligkeiten | 69 |
| 4. Diskussion..... | 72 |
| 4.1 Resümee der Ergebnisse | 73 |
| 4.1.1 Crimping..... | 74 |
| 4.1.2 Implantation..... | 75 |
| 4.1.3 Beschädigungen der Klappen | 77 |
| 4.1.4 Funktion der dTEHV | 77 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| 4.1.5 Makroskopie | 78 |
| 4.1.6 Histologie | 79 |
| 4.1.6.1 Einwachsen und Position des klappentragenden Stents | 79 |
| 4.1.6.2 Endothelialisierung | 79 |
| 4.1.6.3 Remodelling der dezellularisierten tissue-engineerten Klappe | 80 |
| 4.1.6.4 Thromben..... | 82 |
| 4.1.6.5 Verkalkung | 82 |
| 4.2 Vergleich mit ähnlichen Studien | 82 |
| 4.3 Das Schaf als Tiermodell..... | 83 |
| 4.4 Limitationen | 84 |
| 4.5 Ausblick für weitere Arbeiten | 85 |
| 4.6 Schlussfolgerung | 86 |
| 5. Literaturverzeichnis..... | 87 |
| 7. Lebenslauf | 99 |
| 8. Danksagung..... | 100 |
| 9. Bescheinigung des akkreditierten Statistikers..... | 101 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|----------|---|---|
| μ | = | mikro |
| A. | = | Arterie |
| Abb. | = | Abbildung |
| AHF | = | angeborener Herzfehler |
| AZ | = | Allgemeinzustand |
| bzw. | = | beziehungsweise |
| CD | = | cluster of differentiation |
| CT | = | Computertomographie |
| CW | = | continuous wave doppler |
| DHZB | = | Deutsches Herzzentrum Berlin |
| DNS | = | Desoxyribonukleinsäure |
| diast. | = | Diastole |
| dTEHV | = | decellularized tissue engineered heart valve/dezellularisierte tissue-engineerte Herzklappe |
| EDTA | = | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | = | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EKG | = | Elektrokardiogramm |
| EZM | = | Extrazelluläre Matrix |
| FELASA | = | Federation of Laboratory Animal Science Associations |
| FKR | = | Fremdkörperriesenzellen |
| Fr | = | French/Charrière (1 F = 1/3 mm) |
| GV-SOLAS | = | Gesellschaft für Versuchstierkunde-Society of Laboratory Animals |
| HE | = | Hämatoxylin-Eosin |
| ICE | = | intracardiac echocardiography / intrakardiale Echokardiographie |
| i.m. | = | intramuskulär |
| IPPV | = | intermittent positive pressure ventilation |
| i.v. | = | intravenös |
| KG | = | Körpergewicht |
| kg | = | Kilogramm |
| l | = | Liter |
| LAGeSo | = | Landesamt für Gesundheit und Soziales |

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|--------|---|--|
| m. | = | Muskel |
| mg | = | Milligramm |
| ml | = | Milliliter |
| min | = | Minuten |
| MRT | = | Magnetresonanztomographie |
| OP | = | Operation |
| PA | = | Pulmonalarterie |
| PBS | = | phosphate buffered saline/Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PISA | = | isovelocity surface area |
| PW | = | Pulsed Wave |
| RF | = | Regurgitationsfraktion |
| RVOT | = | rechtsventrikulärer Ausflusstrakt |
| s. | = | siehe |
| SMA | = | smooth muscle actin |
| syst. | = | Systole |
| TE | = | Tissue-Engineering |
| TEHV | = | Tissue engineered heart valve / Tissue Engineerte Herzklappe |
| u.v.m. | = | und viele mehr |
| V. | = | Vene |
| VC | = | vena contracta |
| VSD | = | Ventrikelseptumdefekt |
| vWF | = | Van Willebrand Faktor |
| z.B. | = | zum Beispiel |
| ZVD | = | zentraler Venendruck |

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| <i>Abbildung 1: schematische Darstellung der Pulmonalklappe mit ihren drei Taschen.....</i> | <i>13</i> |
| <i>Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Pulmonalklappe während der Diastole und Systole.</i> | <i>17</i> |
| <i>Abbildung 3: schematische Darstellung des Schichtaufbaus der Arteria Pulmonales.....</i> | <i>18</i> |
| <i>Abbildung 4 Übersicht der Kriterien, die eine ideale künstliche Herzklappe erfüllen sollte.....</i> | <i>22</i> |
| <i>Abbildung 5 Schematische Darstellung des Tissue Engineerings.</i> | <i>26</i> |
| <i>Abbildung 6: Ablaufschema des Projekts</i> | <i>30</i> |
| <i>Abbildung 7: exemplarische Aufbau des Operationssaals.....</i> | <i>34</i> |
| <i>Abbildung 8: Scaffold</i> | <i>36</i> |
| <i>Abbildung 9: fertige Klappe vor Implantation</i> | <i>37</i> |
| <i>Abbildung 10: Bioreaktor</i> | <i>38</i> |
| <i>Abbildung 11: Gesamtbild des Katheters</i> | <i>39</i> |
| <i>Abbildung 12: Crimping.....</i> | <i>40</i> |
| <i>Abbildung 13: Ablagesystem.....</i> | <i>40</i> |
| <i>Abbildung 14: Schnittmuster der explantierten Pulmonalklappe.....</i> | <i>42</i> |
| <i>Abbildung 15: Exemplarischer Ablauf der Implantation der Tissue Engineerten Herzklappe.</i> | <i>49</i> |
| <i>Abbildung 16: Übersicht der beim Crimpen beschädigten Klappen.</i> | <i>50</i> |
| <i>Abbildung 17 CT Messung des Tieres 100 nach Implantation der neuen Klappe.</i> | <i>51</i> |
| <i>Abbildung 18 Intrakardiale Echokardiographie.....</i> | <i>53</i> |
| <i>Abbildung 19: Intrakardiale Echokardiographie nach 48 Wochen bei Tier 65.</i> | <i>54</i> |
| <i>Abbildung 20: Übersichtsbilder</i> | <i>57</i> |
| <i>Abbildung 21: Stentperforation.....</i> | <i>58</i> |
| <i>Abbildung 22: Übersicht der Klappenauffälligkeiten.....</i> | <i>59</i> |
| <i>Abbildung 23: makroskopische Endokarditis.....</i> | <i>60</i> |
| <i>Abbildung 24 Tier 65, Haemalaun Färbung.....</i> | <i>61</i> |
| <i>Abbildung 25 Tier 62, α-SMA Färbung.</i> | <i>62</i> |
| <i>Abbildung 26: Endothelialisierungsprozess.....</i> | <i>64</i> |
| <i>Abbildung 27: Wiederbesiedlung</i> | <i>65</i> |
| <i>Abbildung 28: Histologische Präparate des Tieres 73 in der vWF und Häkalaun-Färbung.</i> | <i>66</i> |
| <i>Abbildung 29: Extrazelluläre Matrix.....</i> | <i>67</i> |
| <i>Abbildung 30: Verkalkung</i> | <i>68</i> |
| <i>Abbildung 31: Übersicht der sonstigen, histologischen Auffälligkeiten.</i> | <i>69</i> |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| <i>Tabelle 1: Kollagen und Elastin Gehalt in den unterschiedlichen Klappen und drei unterschiedlichen Altersgruppen.....</i> | <i>15</i> |
| <i>Tabelle 2: Übersicht der unterschiedlichen Ätiologien und Einteilung der angeborenen und erworbenen Herzklappenfehler.</i> | <i>21</i> |
| <i>Tabelle 3 Übersicht der Klappenherstellung.....</i> | <i>35</i> |
| <i>Tabelle 4: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Färbung</i> | <i>43</i> |
| <i>Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Färbungen für die Histologie mit ihren Färbeeigenschaften</i> | <i>44</i> |
| <i>Tabelle 6: CT-Daten der nativen Pulmonalklappe und ihrer angrenzenden Strukturen.</i> | <i>46</i> |
| <i>Tabelle 7: Übersicht der Implantationen der dezellularisierten tissue-engineerten Herzklappen.....</i> | <i>48</i> |
| <i>Tabelle 8: CT Messwerte nach der Implantation der tissue-engineerten dezellularisierten Herzklappe.....</i> | <i>52</i> |
| <i>Tabelle 9: Übersicht der makroskopischen Beurteilung der explantieren Pulmonalklappen.</i> | <i>57</i> |
| <i>Tabelle 10: Scaffoldreste in der Spitze der Taschenklappe, unterteilt nach den Gruppen aus Tabelle 3.....</i> | <i>63</i> |
| <i>Tabelle 11: Übersichtstabelle der histologischen Ergebnisse.</i> | <i>71</i> |

Diagrammverzeichnis

Diagrammverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| <i>Diagramm 1: Versuchsdauerübersicht</i> | <i>47</i> |
| <i>Diagramm 2: Invasive Druckmessung vor und nach Implantation der neuen Herzklappe in Pulmonalposition. ..</i> | <i>51</i> |
| <i>Diagramm 3: Übersicht der Insuffizienzgrade der Klappen im Follow-Up.....</i> | <i>53</i> |
| <i>Diagramm 4: Übersicht Flussbeschleunigung</i> | <i>55</i> |
| <i>Diagramm 5: Quantitativer Fluss (Q-Flow) im Follow-Up über 52 Wochen.</i> | <i>56</i> |

Zusammenfassung der Arbeit

Einleitung Alle bisher auf dem Markt verfügbaren Herzklappenprothesen weisen noch viele Probleme auf. So kommt es bei biologischen Klappen häufig zu frühzeitigen Degeneration oder Entzündungsreaktion. Patienten mit mechanische Herzklappenersatz benötigen eine lebenslange Antikoagulation. Beiden Modellen fehlt die Fähigkeit des Mitwachsens, dies wäre besonders für Kinder ein wichtiger Faktor, um ihnen wiederholte Eingriffe zu ersparen. Mittels Tissue Engineering besteht theoretisch die Möglichkeit, Herzklappen herzustellen, die die beschriebenen Probleme überwinden können. Seit der Jahrtausendwende ist es möglich, Herzklappenprothesen mittels minimalinvasiver Kathetertechnik zu implantieren.

Die hier vorgestellte Arbeit hat die Histologie und Funktion dezellularisierter tissue-engineerter, minimalinvasiv implantierter Herzklappenprothesen zum Gegenstand.

Methode Tissue-engineerte Pulmonalklappen wurde aus Myofibroblasten auf einem bioresorbierbaren Polyglykolsäure-Gerüst in einem Bioreaktor gezüchtet und anschließend dezelluliert. Insgesamt wurden vier verschiedene Klappentypen hergestellt, die sich in Form und der Besiedlungsdauer unterschieden. Die fertige tissue-engineerte Herzklappe wurde in einen Nitinolstent eingenäht und transvenösen minimalinvasiven in 18 Schafen in Pulmonalklappenposition implantiert. Im anschließenden Nachbeobachtungszeitraum von 52 Wochen erhielten die Tiere in regelmäßigen Abständen, CT, MRT, intrakardiale Echokardiographie, Angiografie und invasive Druckmessungen zur Überprüfung der Funktion. Am Ende des Projekts wurden die explantierten Klappen makroskopisch und histologisch untersucht. Hierfür wurden die Klappen in ein Kunstharz eingebettet, immunhistochemisch gefärbt und anschließend histologisch untersucht.

Ergebnisse Alle Klappen konnten implantiert werden. Anfänglich zeigten sich noch Probleme mit der Stabilität der Klappen, sie wurden wahrscheinlich durch das Crimping beschädigt. Diese Probleme wurden in den neueren Klappengenerationen erfolgreich behoben, so dass zehn Tiere das Follow-Up von 52 Wochen erreichten. Hinsichtlich der Funktion zeigten die Klappen sehr gute Ergebnisse, es zeigten sich keine signifikanten Flussbeschleunigungen über der Klappe, d.h. es gab keinen Anhalt für Stenosierung. Nach der Explantation zeigten sich makroskopisch zarte Klappen mit leicht verdickten Klappenrändern. Histologisch war ein gutes Wiederbesiedeln mit körpereigenen Zellen, die Bildung von extrazellulärer Matrix und Endothel zu beobachten.

Zusammenfassung der Arbeit

Diskussion Diese Arbeit zeigt, dass es möglich ist, dezellularisierte tissue-engineerte Herzklappen herzustellen und diese über die transkutane minimalinvasive Methode zu implantieren. Zwar konnte kein Wachstum der Klappe festgestellt werden, da erwachsene Schafe verwendet wurden, dennoch waren die funktionellen und histologischen Ergebnisse der Klappe sehr zufrieden stellend und könnten eine Alternative für die bisherigen biologischen und mechanischen Herzklappenprothesen darstellen.

Abstract

Background All heart valve prostheses currently available on the market still cause significant problems. For example, biological prostheses frequently suffer from an early degeneration or lead to inflammatory reactions. Patients with mechanical heart valve prostheses require lifelong anticoagulant medication. Both models lack the ability to grow with the patient, which would be an important factor for children to avoid repeated interventions. The scope is to use tissue engineering to develop heart valves that can overcome these technical and medical difficulties. Since the turn of the millennium, it has become possible to implant heart valve prostheses using minimally invasive methods. The aim of this work is the histological and functional assessment of decellularized, tissue engineered heart valve prostheses that were implanted using the minimally invasive catheter technique.

Methods The tissue-engineered pulmonary valves were grown from myofibroblasts on biodegradable polyglycolic acid scaffold in a bioreactor and subsequently decellularized. Four different types of valves were created that differed in shape and duration of cultivation. After culture the valves were sewn into a nitinol stent and were then implanted at the pulmonary valve position in 18 different sheep using the transcutaneous minimally invasive method. In the subsequent follow-up of 52 weeks the animals received CT, MRI, intracardiac echocardiography, angiography and invasive pressure examinations in regular intervals to evaluate the function of the heart valve prostheses. After completed follow-up the heart valves were harvested and microscopical and histologically examined. For this purpose, the flaps were embedded in a synthetic resin, stained immunohistochemically, and then cut for microscopical examination.

Results We were able to successfully implant all valves. Initially problems concerning the stability of the valves arose. The valves were most likely damaged by crimping. These problems were successfully dealt with in the newer valve generations, so that ten animals reached the end of the 52-week follow-up period. Regarding function, the valves showed very good results; no significant flow accelerations were across the valves (absence of stenosis). After explanation, macroscopically valves with natural appearance of the main body and slightly thickened edges were observed. Histologically, good re-colonization by autologous cells, production of extracellular matrix and a closed endothelial layer were observed.

Conclusions: This work shows that it is possible to produce decellularized tissue engineered heart valves and to implant them via the transcutaneous minimally invasive method. We were unable to examine any growth of the valves as adult sheep were used in this experiment, but

Abstract

the functional and histological results of the valve were very satisfactory and could represent an alternative for current biological and mechanical heart valve prostheses.

1. Einleitung

1.1 Einführung

Im Laufe eines Lebens von 80 Jahren schlägt das Herz über 3 Milliarden Mal und pumpt dabei mehr als 200 Millionen Liter Blut durch den Körper. Insgesamt besitzt der Mensch vier Herzklappen, davon zwei Segelklappen, die sich zwischen den Vorhöfen und den Herzkammern befinden, die Trikuspidalklappe, die sich zwischen dem rechten Vorhof und der rechten Kammer befindet und die Mitralklappe die zwischen dem linken Vorhof und dem linken Ventrikel liegt. Die Ventrikel werden durch die Taschenklappen begrenzt. Aus dem linken Ventrikel gelangt das Blut durch die Aortenklappe in den großen Blutkreislauf. Die Pulmonalklappe befindet sich am Ausgang des rechten Ventrikels, von dort wird das sauerstoffarme Blut aus dem venösen Kreislauf in den sogenannten Lungenkreislauf abgegeben. Erst durch das konzertierte Öffnen und Schließen der Herzklappen erhält der Blutstrom eine Richtung, Durch das schnelle Schließen der Klappen während der Diastole wird dabei verhindert, dass, das Blut zurückfließt. [1]

Ca. 1% der Neugeborenen leidet an einem angeborenen Herzfehler (AHF) [2]. Der Krankheitsverlauf kann stark unterschiedlich sein, so können einige AHF lange unerkannt bleiben und werden teilweise erst im hohen Erwachsenenalter diagnostiziert, andere werden aufgrund ihrer schweren Symptomatik bereits schon vor der Geburt in der fetalen Echokardiografie erkannt. Viele der AHF betreffen die Pulmonalarterie bzw. die Pulmonalklappe, wie die Pulmonalatrie, die Pulmonalstenose, die Fallot-Tetralogie, das Double Outlet Right Ventricle, Truncus Arteriosus Communis oder die Transposition der großen Herzgefäße.

Lange war die einzige Therapieoption bei Pulmonalklappenfehlern eine Operation am offenen Herzen, die zwar in den meisten Fällen gut verlief, aber gewisse Risiken wie Blutungen, Infektionen bis hin zum Tod mit sich brachten. Außerdem ist eine mindestens 24-stündige Überwachung auf der Intensivstation nötig, sowie weitere Tage auf Station zur Nachsorge nötig. Hierfür können mechanische als auch biologische Klappen verwendet werden. Mechanische Klappen haben den Vorteil, dass sie eine höhere Lebensdauer haben, aber man benötige ein Leben lang eine Antikoagulation und diese Klappen wachsen nicht mit [3].

Seit dem Jahre 2006 besteht die Möglichkeit Ersatzherzklappen vom Schwein oder aus Rinderperikard die in einen Stent eingenäht werden, über einen Katheter zu implantieren. Hierbei wird eine neue Pulmonalklappe mittels eines Katheters über das venöse Blutsystem in die richtige Position gebracht und anschließend über der erkrankten Klappe platziert. Mit Hilfe dieser neuen

1. Einleitung

Implantationstechnik kann vielen Kindern eine große offene Operation am Herzen erspart bleiben. Die Dauer und die anschließende Überwachung und Nachsorge, sowie die Komplikationen und Risiken sind deutlich geringer als nach einer Operation. [4]

Trotz der großen Vielzahl an unterschiedlichen Herzklappenprothesen auf dem Markt, bleiben bis heute viele Probleme ungelöst. Keine der heute auf dem Markt befindlichen Klappen zeigte nach der Implantation ein Wachstum, dies ist besonders für Kinder problematisch, da die Klappen nicht mitwachsen und im Laufe der Zeit insuffizient werden. Des Weiteren besteht die Gefahr, dass die implantierten Herzklappen sich Entzünden oder durch das körpereigene Immunsystem abgestoßen werden und viele der Klappen neigen zur Verkalkung oder Degeneration [5].

1.2 Entwicklung des Herzens und der Herzklappen

Das Herz ist das erste funktionsfähige Organ des Embryos, es zeigt bereits am Ende der 4. Woche erste Kontraktionen. Es entsteht aus dem Mesoderm, das sich zu Beginn noch in der Halsregion befindet, genauer gesagt aus der Prächordalplatte. Dort befindet sich die kardiogene Zone, die hufeisenförmig vor dem Neuralrohr liegt. Hier entstehen zunächst die paarig angelegten Herzschräuche. Ab der 4. Entwicklungswoche entwickeln sich die Herzschräuche und verdrehen sich, daraus entsteht die Herzschräule. Das Herz besteht zunächst aus einem Vorhof, Atrium Primitivum, und einer Kammer dem Ventrikels Primitivums, mit jeweils auch nur einem Ein- bzw. Ausflusstrakt dem Sinus venosus und dem Truncus arteriosus, die erst in der weiteren Entwicklung getrennt werden. Zunächst werden durch die sogenannten Endokardkissen die Vorhöfe von den Kammern getrennt aus denen sich dann die Atrioventrikularklappen (Mitral- und Trikuspidalklappe) bilden. Die Ventrikel werden durch das Septum interventrikulare getrennt, allerdings nicht komplett, es entsteht zunächst das Foramen interventrikularis. Wie oben bereits erwähnt teilen sich die Ventrikel einen Ausflusstrakt, den Truncus arteriosus. Am distalen Ende befindet sich bereits eine Gabelung in die Aorta und die Arteria pulmonalis, von dieser Gabelung aus entsteht ein spiralförmiges Septum, das mit dem interventrikularem Septum verwächst und so das Foramen interventrikularis verschließt und die beiden Kammern mit ihrem jeweiligem Ausflusstrakt verbindet [1,6–8].

Die embryonale Entwicklung der Semilunarklappen geschieht bereits zwischen der 5. und 7. Woche [9]. Am Übergang des Truncus arteriosus und des Conus cordis entstehen während der Entstehung des Septum articopulmonale jeweils drei Endokardkissen aus denen sich die Taschenklappen (Aorten- und Pulmonalklappe) bilden. Die Endokardkissen schließen einen Teil der Endothelzellen ein und wandern dann ins Subendothelgewebe in die Extrazelluläre Matrix

1. Einleitung

[10]. Dort werden die Endothelzellen in Mesenchymalzellen umgewandelt, dieser Prozess wird als Transdifferenzierung bezeichnet [11,12]. Von dort wachsen sie im Verlauf dann zu den Semilunarklappen heran.

1.3 Anatomie und Funktion der Pulmonalklappe

Der Übergang vom rechten Ventrikel in die Ateria pulmonalis wird von der Pulmonalklappe (Valva trunci pulmonalis) gebildet, sie liegt genauer gesagt im Truncus pulmonalis. Bei der Pulmonalklappe handelt es sich, wie bei der Aortenklappe, um eine Taschenklappe (Semilunarklappe), sie besteht aus drei halbmondförmigen Taschen, der Valva trunci pulmonalis dextra, sinistra und anterior. Am oberen Ende der Taschen befindet sich jeweils ein kleines Knötchen die sog. Nodus valvae semilunaris, sie verhindern ein Festkleben der Taschen an der Gefäßwand und ermöglichen einen besseren Schluss der Klappe während der Diastole. Der Bereich in der Mitte der Klappe an dem sich alle Taschen treffen, nennt man Koaptationszone. Die sogenannte Hinge-Region bildet den tiefsten Teil der Taschen, sie ist ebenfalls mit der Gefäßwand verwachsen [13]. In Abbildung 1 ist der Aufbau der Pulmonalklappe schematisch dargestellt.

Die Hauptaufgabe der Klappe besteht darin, den Rückfluss des Blutes aus der Arteria pulmonalis in den rechten Ventrikel zu verhindern. Während der Systole öffnet sich die Klappe und Blut fließt aus der rechten Kammer in die Pulmonalarterie, in der Diastole schließt die Klappe, die Taschen füllen sich und verhindern so den Rückfluss des Blutes. Ein häufiger Befund in der Echokardiografie ist eine leichte Pulmonalklappeninsuffizienz, diese muss nicht zwingend pathologisch sein und wird deshalb auch als physiologische Pulmonalklappeninsuffizienz bezeichnet.

1. Einleitung

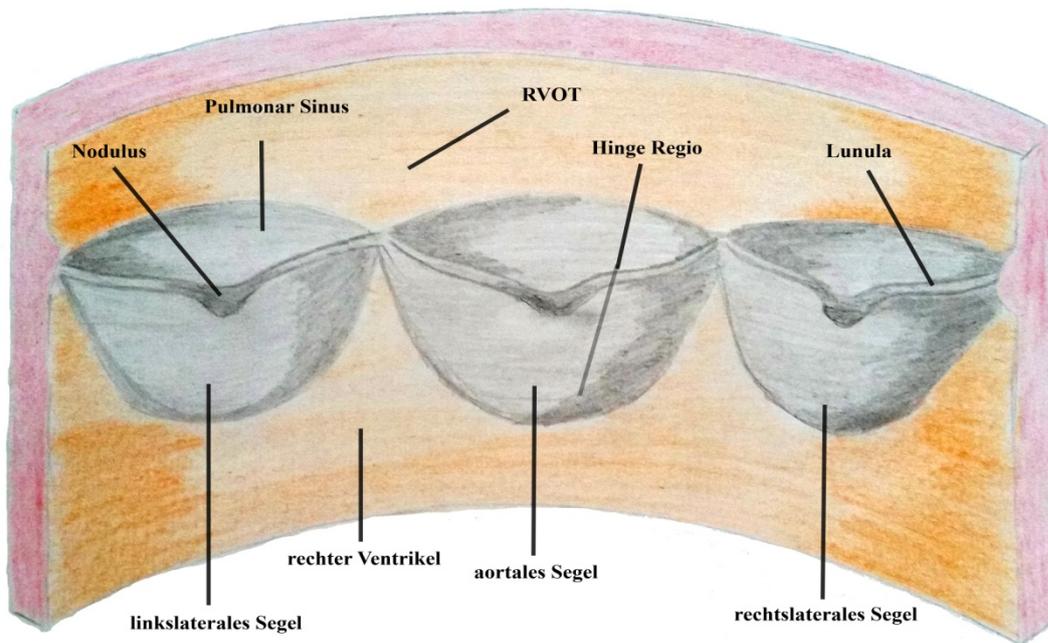


Abbildung 1: schematische Darstellung der Pulmonalklappe mit ihren drei Taschen.

1.4 Zellulärer Aufbau einer Herzklappe

Allgemein unterscheidet man drei Hauptgruppen von Zellen bei Herzklappen: Endothelzellen, die die Oberfläche der Klappe besiedeln und die Fließeigenschaften des Blutes beeinflussen, indem sie die Gerinnung hemmen oder aktivieren, interstitiellen Zellen, die die funktionelle Einheit bilden und glatte Muskelzellen. Bis in die 60er Jahre war man der Ansicht bei Herzklappen handelte es sich um einfache Strukturen die durch ihre passive Bewegung einen gerichteten Blutstrom ermöglichten [14]. Aufgrund dieser Ansicht entstanden künstliche Herzklappen, sowohl mechanisch als auch biologisch. In der Praxis zeigte sich, dass die Lebensdauer und die Funktion nicht der von nativen Klappen entsprachen. Durch weitere Untersuchungen an Herzklappen wurde beobachtet, dass die Klappen komplexe Gebilde aus drei verschiedenen Zelltypen sind, welche auf bestimmte Reize ihrer Umgebung reagieren können [15].

1.4.1 Klappenendothel

Als Endothel wird die zur Blutbahn hingerrichtete Zellschicht der Klappe bezeichnet s. Abb. 3. Sie steht im direkten Kontakt zum Blut und muss deshalb anti-thrombogene Eigenschaften aufweisen. Das Endothel besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel mit Basallamina. Dort finden sich reichlich Weibel-Palade-Körperchen. Hierbei handelt es sich um $0,1 \times 3 \mu\text{m}$ große tubuläre Organellen, die aus speziell angeordneten von-Willebrand-Faktoren bestehen [16].

1. Einleitung

Des Weiteren finden sich in der Endothelschicht viele Aktinfilamente, sie werden auch Stressfilamente genannt, weil sie als Schutz vor Abrissen oder Ablösung dienen. Die Aktinfilamente bilden zusammen mit den Intermediärfilamenten einen wichtigen Teil des Zytoskeletts. Sie betragen ca. 10 nm im Durchmesser und verleihen dem Endothel zusätzlich Stabilität gegen Scherkräfte. Außerdem dienen sie zur Signalübertragung.

Bei künstlichen Herzklappen fehlt diese Schicht oder ist nur teilweise ausgebildet, weshalb es häufig zu Thrombosen und Fibrinauflagerungen kommt, sowie zu bakteriellen Infektionen und Verkalkungen [17].

1.4.2 Interstitielle Zellen

Unterhalb der Endothelschicht befindet sich das Stratum subendotheliale. Es besteht aus einer dünnen Schicht Bindegewebe mit vereinzelt elastischen Fasern. Das darunterliegende Stratum myoelasticum wird in drei Unterschichten unterteilt, die Lamina elastica interna, die Lamina muscularis und die Lamina fibroelastica externa. Hier finden sich glatte Muskelzellen und Kollagenfasern, dazwischen verlaufen vereinzelt Blut- und Lymphgefäße und nicht myelinisierte, hauptsächlich parasymphatische Nerven.

Morphologisch werden zwei unterschiedliche interstitielle Zelltypen unterschieden: Kuboidzellen und längliche spindelförmige Zellen. Beide Zellen haben eine sehr geringe Proliferationsrate, selbst wenn sie extern mit Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Diese Zellen sind in der Lage, extrazelluläre Matrix (Collagen, Elastin, Proteoglykane und Glykosaminoglykane), Zytokine und Chemokine, Wachstumsfaktoren, Matrixmetalloproteasen (MMPs) und ihre Inhibitoren, Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs) herzustellen und so auf Umwelteinflüsse reagieren und sich anpassen zu können [18] [19]. Des Weiteren besitzen sie die Möglichkeit zu kontrahieren [20].

1.4.3 Extrazelluläre Matrix

Als EZM werden alle Makromoleküle im Interzellularraum bezeichnet, die sich außerhalb der Zellen befinden. Sie bilden den Ort für Proliferation und Differenzierung der Klappenzellen und ein dreidimensionales Gerüst, das für Stabilität sorgt. Man unterscheidet verschiedene Formen von Makromolekülen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Den größten Anteil (ca. 55%) bildet das Kollagen, es besteht hauptsächlich aus Prolin und Glycin. Es bilden sich Querverbindungen, die das typische Bild der Kollagenmatrix ergeben. Diese

1. Einleitung

Polypeptidketten werden durch die Ribosomen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums hergestellt. Hierbei handelt es sich um helikal angeordnete Strukturen, die durch Wasserstoffbrückenbindungen ihre Stabilität erhalten. Man unterscheidet mittlerweile 28 verschiedene Typen von Kollagen. Herzklappen bestehen zu 74% aus Typ I, 24% aus Typ III und 2% aus Typ V Kollagen [21], alle drei Typen gehören zu der Gruppe der faserbildenden Kollagene. Kollagenfasern finden sich meist in Wellenform und ermöglichen so sowohl auf Druck als auch auf Zug bestmöglich reagieren zu können. Der Kollagengehalt der Klappen nimmt im Alter bis zu 20% ab und trägt so möglicherweise zum Versagen der Klappe bei (s. Tabelle 1) [22].

| Alter der Patienten in Jahren | Aortenklappe | | Mitralklappe | | Trikuspidalklappe | |
|-------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------------|------------|
| | Kollagen % | Elastin % | Kollagen % | Elastin % | Kollagen % | Elastin % |
| 20-30 | 54,94±1,21 | 12,54 ±0,7 | 58,57 ±6,1 | 9,1 ±0,41 | 57,9±3,02 | 11,42±0,56 |
| 31-60 | 46,46 ±1,98 | 11,19 ±1,01 | 53,15 ±1,32 | 9,13 ±0,77 | 47,45 ± 2,18 | 11,57±0,85 |
| >60 | 42,54 ±3,31 | 12,48 ±1,02 | 47,91 ±2,67 | 11,39 ±0,69 | 46,81±2,07 | 15,12±1,25 |

Tabelle 1: Kollagen und Elastin Gehalt in den unterschiedlichen Klappen und drei unterschiedlichen Altersgruppen.

Alle Angaben beziehen sich auf das fett freie Trockengewicht. (Daten übernommen aus Bashey et al. [22]).

Eine weitere wichtige Komponente der extrazellulären Matrix bildet das Elastin. Es verleiht den Klappen die charakteristische Eigenschaft der Elastizität. Durch den Verbund von Elastin und Kollagen sind die Herzklappen elastisch und reißfest zugleich, da sich die beiden Bestandteile in ihrer Funktion ergänzen. Wie oben bereits beschrieben, ordnen sich die Kollagenfasern in Wellenform an (s. Abb. 2), die Elastinfasern binden sich in diese Wellenform ein, um so die Kollagenfaser elastischer zu machen[23]. Sowohl in der Mitralklappe als auch in der Trikuspidalklappe nimmt der Elastingehalt im Laufe des Lebens leicht zu, an der Aortenklappe konnte dies nicht beobachtet werden (s. Tabelle 1). Elastin machen ca. 13% des Trockengewichts einer Herzklappe aus.

Proteoglykane machen mit ca. 20% des Trockengewichts den zweitgrößten Anteil der EZM aus [24]. Hierbei handelt es sich um großmolekulare Bestandteile, die zu einem Großteil aus Kohlenhydraten, ca. 95%, und einem kleinen Anteil aus Proteinen ca. 5%, bestehen. Proteoglykane lagern sich zwischen dem oben beschriebenen Kollagen-Elastin-Netzwerk ab und bilden durch ihre hohe wasserbindende Kapazität eine geartige Grundsubstanz. Diese Grundsubstanz be-

1. Einleitung

steht aus verschiedenen Glykosaminoglykane, wie Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatan sulfat und einem kleinen Anteil Heparansulfat. Im Laufe des Lebens nehmen der Wassergehalt und der Glykosaminoglykaneanteil ab, wohingegen der Fettgehalt zunimmt [25].

1.4.4 Schichtaufbau der Semilunarklappe

Die drei Komponenten, Kollagen, Elastin und Proteoglykane, sind nicht in allen Teilen der Klappe gleich verteilt, sie bilden durch unterschiedliche Konzentrationen verschiedene Schichten aus.

1. Unterhalb des Endothels, an der Innenseite der Tasche, befindet sich die Lamina fibrosa, sie besteht hauptsächlich aus Kollagen und einen geringen Anteil an Elastin und hat eine Dicke von 21-48 μm [26]. Sie ist aufgrund des hohen Kollagenanteils, der sich parallel und wellenförmig zum oberen, offenen Taschenrand ausbreitet, die steifste Schicht der Klappe. Durch den wellenförmigen Verlauf kann die Klappe während der Diastole komplett schließen und bietet Stabilität gegenüber hohen Drücken.
2. Darunter liegt die Lamina radialis, sie besteht aus radial angeordnetem Kollagen und Elastin, mit einer Stärke von 58-108 μm .
3. Darunter befindet sich eine 40-300 μm dicke Schicht aus vereinzelt retikulären Fasern aus Kollagen und Elastin, hier überwiegen die Proteoglykane und verleihen dieser Schicht ihren geleartigen Charakter. Durch diese Eigenschaft ist diese Schicht besonders wichtig in Bezug auf äußere Scherkräfte, sie wirkt wie eine Art Stoßdämpfer zwischen der Lamina ventrikularis und der Lamina fibrosa [10,25].
4. Die Lamina ventrikularis ist die äußerste Schicht, sie befindet sich an der konvexen Seite der Klappe, die zum Ventrikel gerichtet ist. Hier überwiegen die Elastinfasern den Kollagenfasern, was dieser Schicht eine sehr dehbare Eigenschaft verleiht und ermöglicht so ein suffizientes Öffnen der Klappe in der Systole [27]. In der Abb. 2 ist die Pulmonalklappe mit ihren Schichten während der Systole und Diastole dargestellt.

1. Einleitung

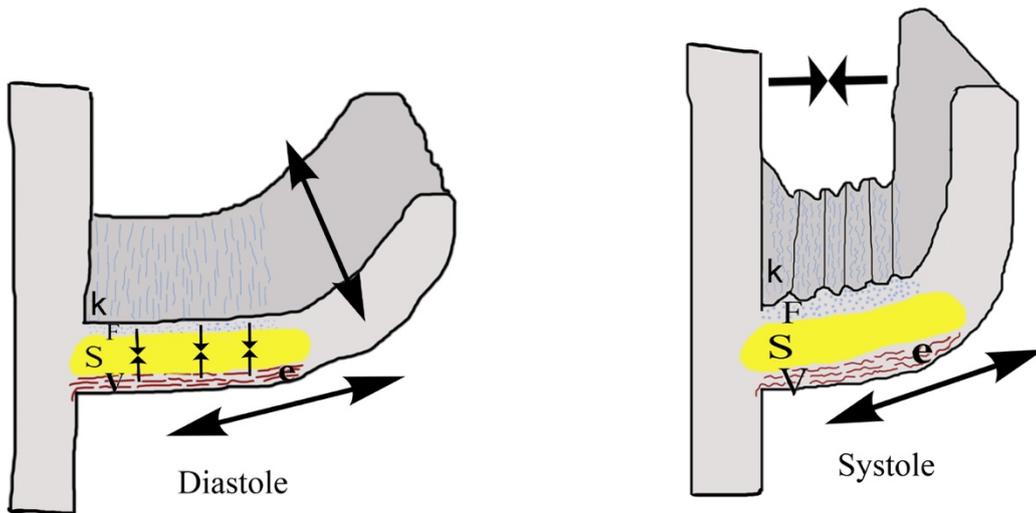


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Pulmonalklappe während der Diastole und Systole.

Durch die Pfeile werden die Scherkräfte, die während der unterschiedlichen Phasen wirken, dargestellt. k = kollagene Fasern, F = Lamina fibrosa, S = Spongiosa, V = Lamina ventricularis, e = elastische Fasern. (Abgeändert nach Mendelson 2006 [17])

1.4.5 Schichtaufbau der Arteria pulmonalis

Die Wand größerer Blutgefäße besteht aus drei unterschiedlichen Schichten (s. Abb. 3):

1. Tunica intima
2. Tunica media
3. Tunica externa, oder auch Tunica adventitia genannt.

Die Tunica intima ist die innerste Schicht und hat direkten Kontakt zur Blutbahn. Sie ist mit Endothel ausgekleidet. Die Endothelzellen sind flache polygonale Zellen, die in das Lumen hereinragen. Die Zellkerne sind rund bis oval. Dem Endothel werden eine Vielzahl von physiologischen Prozessen zugeschrieben [28-29]:

1. Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe
2. Hemmung oder Aktivierung der Blutgerinnung
3. Regulation des Blutdruckes über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid
4. Angiogenese
5. Beteiligung an Entzündungsvorgängen

1. Einleitung

Direkt unter dem Endothel befindet sich eine schmale Basallamina. Des Weiteren besteht die Tunica intima aus einer dünnen Schicht lockerem Bindegewebe mit Fibroblasten, einzelnen glatten Muskelzellen, Kollagenfasern und Mikrofibrillen [29].

Die Tunica media ist die mittlere Schicht, sie liegt zwischen der Tunica intima und der adventitia. Sie ist die dickste Schicht und besteht aus einem Netz aus spiralförmig angeordneten glatten Muskelzellen, elastischen Fasern und Kollagen. In der Arteria pulmonalis überwiegen die elastischen Fasern und es gibt deutlich weniger glatte Muskulatur als in den mittelgroßen Arterien. Die Media verleiht den Gefäßen ihre elastische Eigenschaft und ermöglicht in der Aorta z.B. die Windkesselfunktion. In den mittelgroßen Gefäßen nimmt der Anteil der glatten Muskelzellen zu und ermöglicht durch die Kontraktion ein Aufrechterhalten des kontinuierlichen Blutflusses.

Die äußerste Schicht wird als Serosa bezeichnet und ist ein Teil der Tunica adventicia. Sie setzt sich aus überwiegend längsverlaufenden Kollagenfaser, Fibroblasten und einem lockeren Netz aus elastischen Fasern zusammen. In dieser Schicht verlaufen Nerven, Lymph- und Blutgefäße (vasa vasorum) für die nervale Innervation und metabolische Versorgung der Blutgefäße. [30]

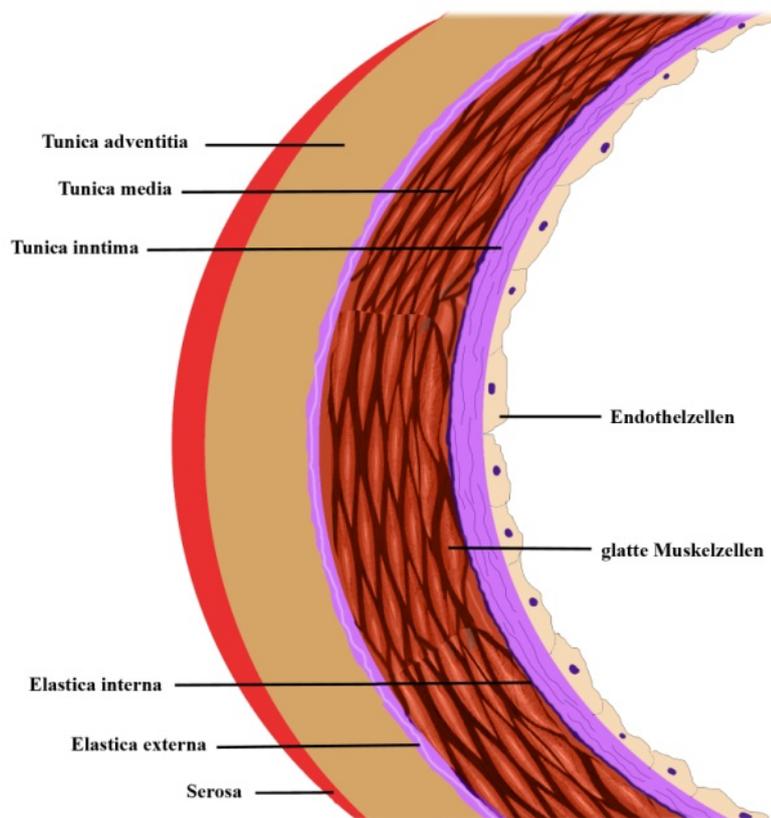


Abbildung 3: schematische Darstellung des Schichtaufbaus der Arteria Pulmonales.

1.5 Erkrankungen der Herzklappen

Erkrankungen der Pulmonalklappe sind im Erwachsenenalter sehr selten, viel häufiger ist hier die Aortenklappe bzw. die Mitralklappe betroffen (s. Tabelle 2). Bei Kindern sind Pulmonalklappendefekte die häufigsten angeborenen Herzklappenfehler [31].

Bis zum Jahre 2050 wird die Weltbevölkerung auf über 9,7 Milliarden steigen [32], die Population der über 60-Jährigen wird von 12% auf 22% steigen und begleitend wird sich die Zahl der jährlich weltweiten Herzklappenersatztherapie verdreifachen, von ca. 290.000 auf 850.000 [33]. Hierbei wird es sich hauptsächlich um Aortenklappen handeln, da diese sich häufig im Alter degenerativ verändern [34].

1.5.1 Angeborene Herzklappenfehler

Die Inzidenz für einen angeborenen Herzfehler (AHF) liegt zwischen 2,5 bis 3 auf 1.000 Lebendgeburten [2]. In Deutschland liegt die bevölkerungsbezogene Gesamtprävalenz bei 1,1% [31].

Den angeborenen Herzklappenfehler kann man in drei Gruppen einteilen: Stenose, Insuffizienz und Atresie. Bei der Insuffizienz handelt es sich um eine Undichtigkeit der Klappe. Die Klappe schließt nicht mehr vollständig und es kommt zu einem Rückfluss des Blutes während der Diastole. Eine Insuffizienz der Pulmonalklappe tritt häufig nach komplexen operativen oder interventionellen Eingriffen an der Pulmonalklappe auf. Zudem besteht bei Patienten mit erhöhtem Lungendruck eine Insuffizienz der Pulmonalklappe, diese dient auch als Parameter um den Lungendruck echokardiographisch einschätzen zu können [35]. Die Stenose beschreibt eine Verengung der Klappe, sie öffnet sich nicht mehr komplett und es kommt zu einem Rückstau des Blutes vor der betroffenen Klappe z.B. bei der Pulmonalklappenstenose. Von einer Atresie spricht man, wenn eine Klappe nicht angelegt ist, z.B. bei der Pulmonalatresie. Hier ist die Pulmonalklappe nicht vorhanden und es existiert keine physiologische Verbindung aus dem rechten Herz in die Lunge, ein Überleben ist nur durch Umgehungskreisläufe möglich.

Bei Kindern, die an einer syndromalen Erkrankung leiden, treten angeborene Herzfehler häufiger auf. Bei der Trisomie 21 auch bekannt als Down-Syndrom handelt es sich um die häufigste Chromosomenaberration bei Neugeborenen. 40% dieser Kinder kommen mit einem angeborenen Herzfehler auf die Welt. Hierbei handelt es sich in erster Linie um einen Atrioventrikulären Septum Defekt (45%), aber es treten auch vermehrt Defekte auf die, die Klappen betreffen, wie z.B. die Fallot'sche Tetralogie (7%) [36] [37].

1. Einleitung

Patienten, die am Marfan-Syndrom erkrankt sind, haben auch häufiger angeborenen Herzklappenfehlern [2]. Durch den fehlerhaften Aufbau im Bindegewebe, kommt es häufig zu Veränderungen der Aorta und damit zu einer Insuffizienz der Aorten bzw. der Mitralklappe, da die Klappen nicht mehr richtig schließen können.

1.5.2 Erworbene Herzklappen Vitien

Prinzipiell gibt es zwei Hauptgruppen der erworbenen Herzklappen Vitien. Einerseits die Stenose, bei der die Klappe sich nicht mehr richtig öffnen kann und so den Blutfluss behindert, andererseits die Insuffizienz, bei der die Klappe nicht mehr richtig schließt und so das Blut am Ende der Systole wieder zurück fließt [10]. Das häufigste erworbene Vitium ist die Aorteklappenstenose, auf Grund einer Kalzifizierung der Taschen und des Annulus verliert die Klappe ihre Elastizität und es kann kein physiologischer Blutfluss mehr stattfinden [34]. Eine weitere Ursache für erworbene Vitien, ist die Endokarditis. Durch den Entzündungsprozess kann es zur Zerstörung der Klappe kommen. In Tabelle 2 sind die häufigsten Herzklappenerkrankungen kurz zusammengefasst.

| <u>Übersicht der verschiedenen Herzklappenerkrankungen</u> | |
|---|--|
| Pulmonalstenose | Meist angeboren z.B. bei der Fallot'schen Tetralogie. Macht ca. 10% der angeborenen Herzklappenfehler aus [38,39]. |
| Pulmonalinsuffizienz | Selten angeboren. Häufiger Befund in der Echokardiografie, meist aber ohne pathologischen Stellenwert als „physiologische Insuffizienz“. Selten erworben durch z.B. Endokarditis, Pulmonale Hypertonie, operative oder interventionelle Eingriffe oder Trauma [35,40]. |
| Pulmonalatresie | Seltener angeborener zyanotischer Herzfehler (0,3%) [31], man unterscheidet zwei Formen, mit oder ohne Ventrikelseptumdefekt (VSD). Schnelle Therapie nötig, da hohe Mortalität [41–43]. |
| Aortenstenose | Seltener angeborener Herzfehler, meist durch Fehlanlage der Taschen (bikuspide, monokuspid sowie Verwachsungen der Taschen) [44]. Die Hauptursache bei Erwachsenen älter als 70 Jahren sind degenerative Veränderungen 48% gefolgt von postinflammatorischen Ursachen mit 27% [34] |
| Aorteninsuffizienz | Selten angeboren z.B. durch Taschenfehlanlage, eher nach Operationen oder Inflammation zu beobachten. [45,46] |
| Mitralstenose | Häufigster erworbener Herzklappenfehler, meistens durch rheumatisches Fieber ausgelöste Endokarditis. Tritt vermehrt bei Frauen auf und oft in Kombination mit einer Aortenstenose [47]. |

1. Einleitung

| | |
|--------------------------------|--|
| Mitralinsuffizienz | Seltener angeborener Defekt, tritt aber vermehrt in Kombination mit anderen Herzfehlern wie der Transposition der großen Arterien auf. Beim Erwachsenen tritt er häufig nach Infarkten auf, wodurch es zu einem Papillarmuskelabriss kommen kann [47]. |
| Trikuspidalstenose | Sowohl die hochgradige Trikuspidalstenose wie auch die Trikuspidalinsuffizienz sind sehr selten und treten meist in Kombination mit anderen Klappenfehlern auf. |
| Trikuspidalinsuffizienz | Isolierte Erkrankungen der Trikuspidalklappe haben meist einen rheumatischen Ursprung [48]. Häufig erkranken Patienten, die intravenöse Drogen konsumieren, an einer Endokarditis, die zu einer Insuffizienz führen kann [49]. |

Tabelle 2: Übersicht der unterschiedlichen Ätiologien und Einteilung der angeborenen und erworbenen Herzklappenfehler.

1.6 Ersatzverfahren

Im Jahre 2014 wurden allein in Deutschland 100.398 herzchirurgische Eingriffe durchgeführt, davon handelte es sich um 31.359 Operationen der Herzklappen (inklusive 9.194 Eingriffe durch Katheter) [50] die somit neben der Bypass Operation die zweit häufigste Indikation darstellen. Weltweit werden jährlich ca. 280.000 Herzklappen ersetzt [51].

Es stehen viele verschiedene Typen von Herzklappenprothesen zur Verfügung [52]. Mechanischen Herzklappen haben den Vorteil, dass sie eine längere Haltbarkeit, als biologische Herzklappenprothesen aufweisen. Auf der anderen Seite steht das Thromboserisiko, das mit 1% pro Jahr angegeben wird [53]. Die Patienten benötigen deshalb eine lebenslange Antikoagulation [54]. Diese Herzklappen werden bevorzugt bei jüngeren Erwachsenen verwendet, da sie von der langen Haltbarkeit profitieren. Aufgrund ihrer Größe und Steifigkeit können diese Klappenprothesen nicht minimalinvasiv implantiert werden.

Als Alternative zu den mechanischen Klappen gibt es biologische Klappenprothesen. Hier unterscheidet man Xenografts¹, bei denen es sich um speziesfremdes Material handelt (z.B. porcine² Herzklappen oder bovines³ Perikard). Als Allografts⁴ bezeichnet man Herzklappen, die von der gleichen Spezies stammen. Bei der Ross-Operation wird die Aortenklappe durch die körpereigene (Autograft⁵) Pulmonalklappe ersetzt und als neue Pulmonalklappe eine allogene Klappe eingesetzt [55]. Es konnte gezeigt werden, dass die Pulmonalklappe den hohen Drücken in der Aortenklappenposition deutlich besser standhalten kann als eine körperfremde Klappe.

¹ Vom anderer Spezies stammend

² Vom Schwein stammend

³ Vom Rind stammend

⁴ Vom gleicher Spezies stammend

⁵ Körpereigene

1. Einleitung

Aufgrund der biologischen Eigenschaften der Herzklappen ist hier keine lebenslange Antikoagulation nötig. In den ersten 3 Monaten wird eine Antikoagulation durchgeführt, um so eine ideale Endothelialisierung zu ermöglichen [3,56]. Allerdings weisen diese Klappen, im Vergleich zu mechanischen Klappen, eine deutlich kürzere Haltbarkeit von ca. 15 Jahre auf [57]. Zudem neigen die Klappen schneller zur Kalzifizierung und damit einhergehend zu einer Verminderung der Klappenbeweglichkeit bzw. der Öffnungsfläche [58]. Außerdem kommt es häufig zu Entzündungs- und Abstoßungsreaktion der Klappen [59]. Diese Klappen werden bevorzugt bei älteren Menschen, bzw. kontraindizierte Antikoagulation, verwendet.

Alle existierenden unterschiedlichen Klappenkonzepte haben ihre Vor- und Nachteile, die ideale künstliche Herzklappe ist mit ihren Eigenschaften in Abb. 4 beschrieben.

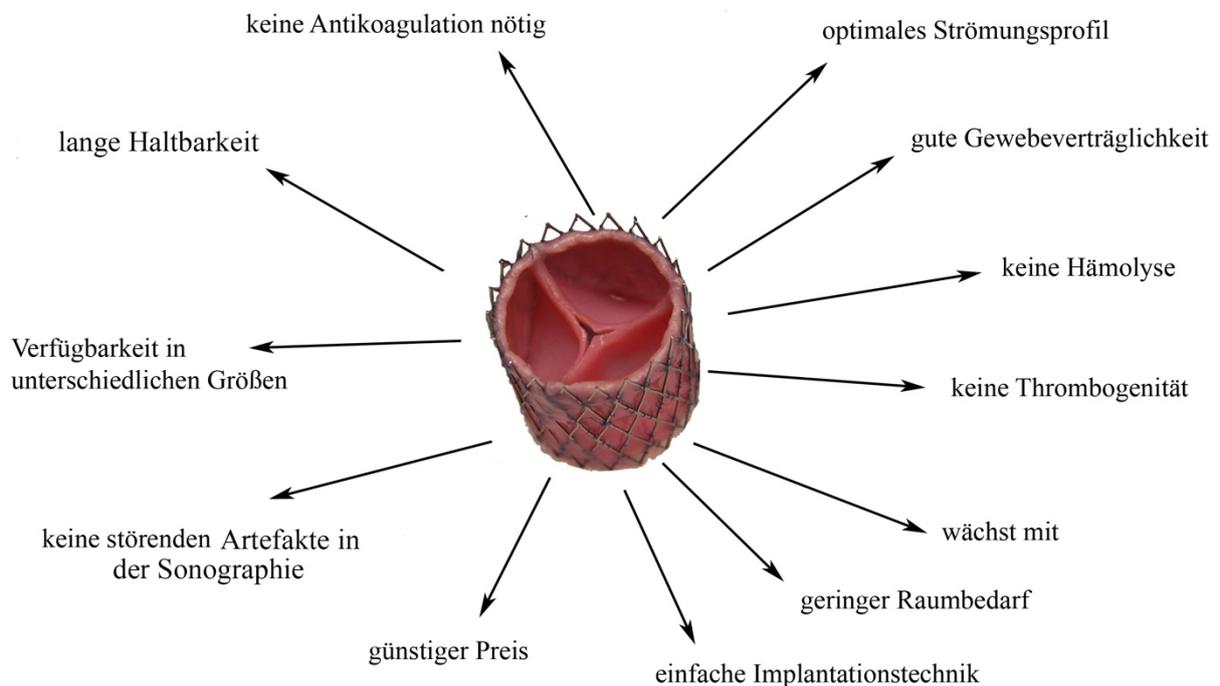


Abbildung 4 Übersicht der Kriterien, die eine ideale künstliche Herzklappe erfüllen sollte.

Viele dieser Eigenschaften erfüllen die Tissue-engineerte Herzklappen bereits [60–62].

1.6.1 Operative Herzklappenimplantation

1952 gelang es dem US-Amerikaner Hufnagel als ersten, eine künstliche Herzklappe zu implantieren [63]. Seitdem wurden mehr als 80 verschiedene Klappenersatzprothesen hergestellt und getestet [64]. Bei der operativen Klappenersatz-OP ist die Eröffnung des Thorax erforderlich und der Patient muss an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen werden. Es handelt sich

1. Einleitung

um einen risikoreichen Eingriff [65]. Kathetergestützte Verfahren bieten eine risikoärmere Alternative, allerdings lassen sich nicht alle Eingriffe mit einem Katheter durchführen, wie z.B. die Implantation mechanischer Klappen.

1.6 2 Minimalinvasive Implantationswege

Im Jahre 2002 wurde die erste Aortenklappe minimal invasiv über die Femoralarterie implantiert [66]. Bereits 2 Jahre vorher gelang es der Arbeitsgruppe um Bonhoeffer et al. 2000 [67] einem 12-jährigem Jungen, über die Femoralarterie eine aus einer Rindervene hergestellte Klappe in Pulmonalposition zu implantieren. Die neue Implantationstechnik wurde zuvor an Tieren erfolgreich getestet und wurde weiterentwickelt, sodass sie im Jahre 2006 unter dem Namen Melody® Valve (Medtronic LifeLine CardioVascular, Dublin, Irland) als erste Pulmonalklappenprothese ihr Zulassung in der EU erhielt. Die Klappe wird vor der Implantation, gecrimpt⁶ und in einen Implantationskatheter (Ensemble®) geladen. Anschließend wird diese über eine venöse Schleuse (22 Fr.) in die Pulmonalklappen Position gebracht und mittels Ballondilatation über der nativen Klappe platziert. Die Klappe ist in den Durchmessern 18, 20 und 22mm erhältlich [4]. Im Zeitraum zwischen Dezember 2006 und September 2013 wurden alleine in Deutschland bereits 1003 Patienten mit einer Melody Klappe versorgt. Im ersten Jahr der Nachbeobachtung zeigten sich funktional gute Ergebnisse der Herzklappenprothese, allerdings kam es in 11% der Fälle zu Stentbrüchen und zu einer Endokarditisrate von 2,7% [68].

Um die Klappen in den Implantationskatheter einbringen zu können, müssen sie zuerst gecrimpt (zusammengerollt) werden. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Vorgang irreparable Schäden an den Kollagenfasern hinterlässt [69]. Da sich das Crimping aber nicht vermeiden lässt, wird empfohlen, es unmittelbar vor der Implantation durchzuführen, sowie den größtmöglichen Durchmesser zu wählen, da die Schäden mit der Dauer und dem geringeren Durchmesser des Crimpens zunehmen [70][71].

Minimalinvasiv implantierbare Klappen werden in einen Stent eingenäht, der sie an der gewünschten Position verankert. Bei den Stents unterscheidet man zwei verschiedene Systeme. Es gibt selbstexpandierende Stents und nicht selbstexpandierende Stents, letztere werden mittels eines Ballons implantiert [72].

Ein weiterer Vorteil der minimalinvasiven Technik ist, dass eine bereits voroperierte Klappe einfach überstentet werden kann [73]. Das bedeutet, dass eine z.B. insuffiziente Klappe durch das gleiche Prinzip wie die zuvor implantierte Klappe wieder ersetzt werden kann, ohne dass

⁶ zirkulär gefaltet

1. Einleitung

eine Herz-Thorax-Operation erforderlich ist. Dies bietet den Vorteil, die beschädigte Klappe nicht entfernen muss. Bei diesem Valve-in-Valve Verfahren kommt es zwar häufiger zu paravalvularen Lecks (Regurgitation zwischen Klappe und Gefäßwand), dafür sind die postoperativen Risikofaktoren deutlich geringer [74].

Einen weiteren Zugangsweg bietet die transapikale Implantationstechnik, hierbei wird ein Interkostalraum auf Höhe der Herzspitze frei präpariert, anschließend die Herzspitze punktiert und mittels Seldinger-Technik ein Implantationskatheter bis in die gewünschte Position eingebracht. Diese Methode wurde bereits im Rahmen des Tissue Engineerings am Tier sowie auch am Menschen angewandt [75,76].

Um eine möglichst präzise Implantation einer Herzklappe mittels Katheter am schlagenden Herz zu gewährleisten, gibt es die Möglichkeit die Herzfrequenz medikamentös mittels Adenosin kurzzeitig zu senken und so die Klappe genauer an die gewünschte abzulegen. [77] Dies funktioniert nicht nur durch eine Verlangsamung der Herzfrequenz, sondern auch durch eine Erhöhung. Durch das sogenannte „Overpacing“ oder „rapid pacing“ wird die Herzfrequenz kurzzeitig, durch elektrische Stimulation, auf 200 Schläge pro Minute erhöht und auch so eine genauere Platzierung der Klappe ermöglicht. [78]

1.7 Tissue Engineering

Spätestens seitdem Vacanti und Langer Anfang der 90er Jahre das Tissue Engineering vorstellten und die Bilder von der „Maus mit dem menschlichen Ohr auf dem Rücken“ um die Welt gingen [79], ist das Tissue Engineering ein großer Bestandteil der aktuellen Forschung in vielen verschiedenen Bereichen. Ziel des Tissue Engineerings ist es, komplette Organe bzw. Teile von Organen künstlich aus körpereignen Zellen herstellen zu können. Versuche, komplette Organe wie Leber oder Niere herzustellen, blieben bisher erfolglos. Es werden bereits Gewebe wie Haut und Knorpel erfolgreich gezüchtet und klinisch getestet [80]. Bereits im Jahre 1995 wurden einzelne Herzklappentaschen mittels Tissue Engineering hergestellt und in Schafe implantiert [81]. Seitdem wird mit großem Interesse weiter an tissue-engineerten Herzklappen (TEHV⁷) geforscht, um das Problem des fehlenden Wachstums und Anpassungsvermögen von gegenwärtigen Prothesen zu überwinden. Andere Hürden konnten dank des Tissue Engineerings be-

⁷ tissue engineered heart valve

1. Einleitung

reits überwunden werden. So benötigen TEHV keine Antikoagulation, da sie aus körpereigenem Gewebe bestehen. Sie sind in verschiedenen Größen herstellbar und man ist nicht mehr auf eine Spenderklappe oder Spenderzellen angewiesen.

1.7.1 Herstellung von tissue-engineerten Herzklappen

Für die Herstellung einer TEHV werden körpereigene reproduktionsfähige Zellen benötigt. Es gibt verschiedene Zellquellen, die verwendet werden können, z.B. Arterien [82], Venen [83], Blut [84] u.v.m. Anschließend werden die entnommenen Zellen isoliert und *in vitro*⁸ gezüchtet und vermehrt. Wenn sich die Zellen erfolgreich vermehrt haben werden sie auf einen bioresorbierbaren Scaffold⁹ aufgetragen und durch mechanische Reize und Wachstumsfaktoren stimuliert, sowie mit Nährstoffen versorgt. Der Scaffold soll den neuen Zellen so lange als Gerüst dienen, bis die Zellverbände so stark sind, dass sie genügend Stabilität aufweisen, um sich selbst zu stützen. Die mechanische und physikalische Stimulation der Klappen erfolgt in einem sogenannten Bioreaktor. Hier werden ähnliche Bedingungen wie im echten Herzen hergestellt [85]. Es werden pulsierende Druck- und Flussverhältnisse erzeugt, die sich positiv auf das Wachstum der Zellen auswirken [86]. Wenn sich die Zellen nun gleichmäßig auf dem Scaffold vermehrt haben und den Scaffold nicht mehr benötigen, kann die TE-Klappe in einen Stent eingenäht werden und anschließend implantiert werden (s. Abb. 5). Die Taschen der Klappe sind nach der Herstellung noch miteinander verwachsen und müssen aufgetrennt werden. Durch diesen mechanischen Eingriff entsteht häufige bereits das Problem, dass die Taschen nicht mehr komplett schließen. Durch den Abbau des bioresorbierbaren PGA-Scaffolds kann es ebenfalls zu einer weiteren Verkürzung der Taschen kommen, da die Stützfunktion des Scaffolds nicht mehr komplett gegeben ist. Ein weiteres beobachtetes Phänomen ist die Verkürzung der Taschen durch zelluläre Zugkräfte, bei dezellularisierten Klappen scheint dieses Phänomen aber deutlich reduziert zu sein [87].

⁸ unter kontrollierten Bedingungen außerhalb des Organismus

⁹ Formgebendes Gerüst

1. Einleitung

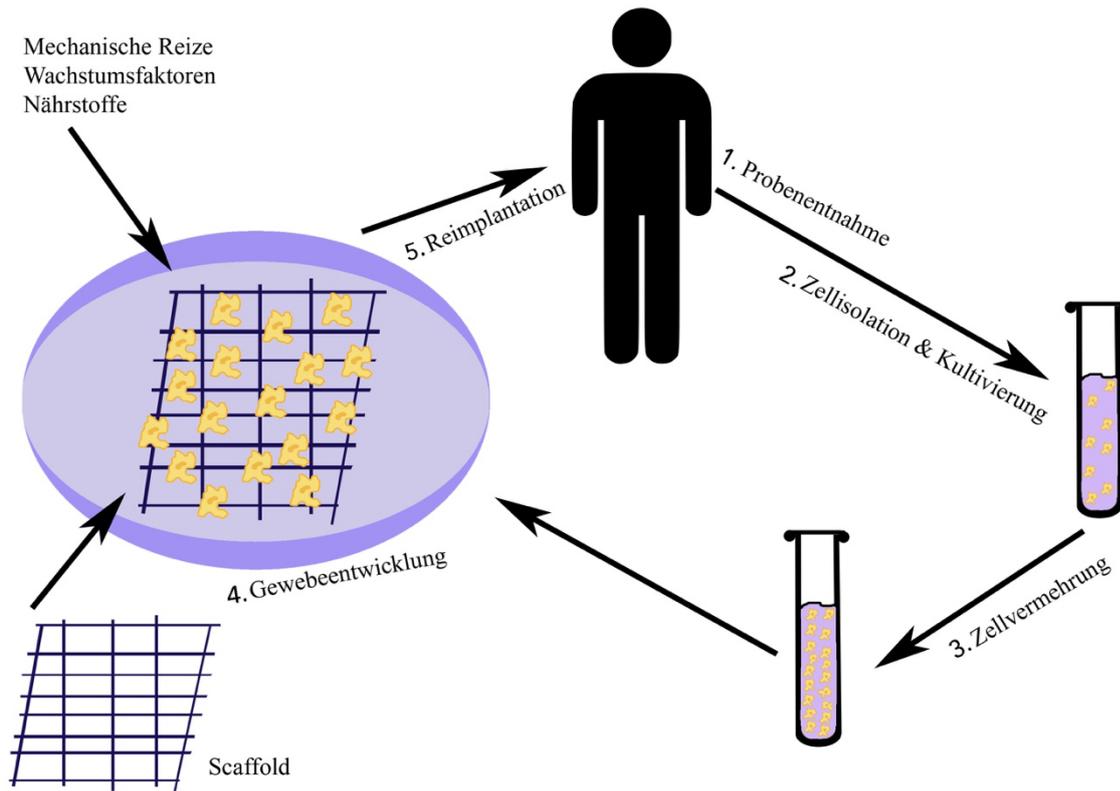


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Tissue Engineerings.

1. Probenentnahme, 2. Zellisolation und Zellkultivierung, 3. Zellvermehrung, 4. Zellen auf Scaffold übertragen und durch mechanische Reize und Wachstumsfaktoren stimulieren, sowie mit Nährstoffen versorgen 5. Reimplantation der hergestellten tissue-engineerten Herzklappe

1.7.2 Dezellularisierung von Herzklappen

Neben der klassischen Methode zur Herstellung von tissue-engineerten Herzklappen gibt es auch noch andere Verfahren. Bei der Dezellularisierung handelt es sich um ein Verfahren bei dem sämtliche Zellen und DNS Bestandteile aus dem Präparat ausgewaschen werden. Hierfür können verschiedene Substanzen verwendet werden, die alle den unvermeidbaren Nachteil haben die Extrazelluläre Matrix zu schädigen [88].

1. Physikalisch: durch Kälte, hydrostatischen Druck, Elektroporation¹⁰
2. Chemisch: durch hypo/hypertone Puffer, Säuren/Basen, Alkohole, Detergents¹¹, andere Lösungsmittel wie z.B. Aceton
3. Biologisch: durch Enzyme, nicht enzymatische Mittel wie z.B. EDTA oder EGTA

Als Präparate werden hier hauptsächlich Xeno- oder Homografts verwendet. Die Arbeitsgruppe um Cebotari [89] implantierte 38 Kindern und jungen Erwachsenen einen dezellularisierten

¹⁰ Verfahren bei der die Zellmembran permeabel gemacht wird

¹¹ Übersetzt: Wasch-Reinigungsmittel, wäscht die DNS und Zellbestandteile aus der Zelle

1. Einleitung

Allograft in Pulmonalposition. Diese wurden mit Patienten aus einer Kontrollgruppe verglichen, die eine in Glutaraldehyde fixierte Rinderklappe oder einen kryokonservierten¹² Homograft erhalten hatten. In der fünfjährigen Nachbeobachtungszeit zeigten die dezellularisierten Allografts sehr gute funktionelle Ergebnisse, vereinzelt traten leichte Insuffizienzen auf. Es musste keine der Klappen frühzeitig explantiert werden. Die Klappenmodelle aus der Kontrollgruppe schnitten im Vergleich deutlich schlechter ab [89].

Andere Klappen wie die Synergraft® (Synergraft®, CyroLife Inc, Kennesaw, GA, USA) oder die Matrix P® (Matrix P®, Auto Tissue GmbH, Berlin, Germany) zeigten in mehreren Studien schlechte Ergebnisse und werden nicht mehr empfohlen [90–93]. Bei beiden Klappenmodellen handelt es sich um Xenografts, Matrix P® aus equinem¹³ Perikard und Synergraft™ aus Schweineperikard. Das Synergraft™ Modell zeigte im Schaf sehr gute Ergebnisse. Die Gruppe um Simon implantierte diese Klappe bei vier Kindern erfolgreich. Drei der Kinder verstarben, zwei nach sechs Wochen bzw. nach einem Jahr aufgrund von schwerer Degeneration der Klappe, eins am 7. postoperativen Tag aufgrund einer Ruptur der Klappe [85]. Dem 4. Kind wurde die Klappe prophylaktisch am 2. postoperativem Tag entfernt. Alle Klappen zeigten bei der Explantation makroskopisch sichtbare Entzündungszeichen, sowie Anzeichen für Kalzifizierung. Eine Rezellularisierung der Klappe konnte nicht beobachtet werden [90]. Auch die Matrix P® Klappe wurde erfolgreich im Tiermodell getestet. Perri et al. implantierten 93 Patienten/-innen im mittleren Alter von 20 Monaten eine Matrix P® Klappe. Ein Kind verstarb bei der Implantation, vier weitere an postoperativen Komplikationen, die aber nicht mit der Klappe in Verbindung standen. In der zweijährigen Nachbeobachtungszeitraum zeigte sich bei den verbleibenden 88 Patienten ein komplettes Versagen der Klappe in 60,2% der Fälle und 77,4% entwickelten eine Insuffizienz [92].

1.7.3 Tissue-engineerte Herzklappen in der Forschung

Komplett tissue-engineerte Herzklappen haben bis heute noch keinen Einzug in die klinische Testung am Menschen erhalten. Bereits im Jahre 1995 implantierten Shinoka et al. eine autologe tissue-engineerte Pulmonalklappentasche auf Basis eines bioresorbierbaren Scaffolds [81]. Seitdem erscheinen viele veröffentlichte Arbeiten, die sich mit dem Thema des Tissue Engineerings beschäftigt haben. In diesem Gebiet wurden große Fortschritte gemacht, dennoch gibt es

¹² Dezellularisierungsverfahren durch Kälte (meist durch flüssigen Stickstoff)

¹³ vom Pferd stammend

1. Einleitung

bis heute keine Studie, die zeigen konnte, dass tissue-engineerte Klappen die Möglichkeit besitzen zu wachsen [94]. Zwar konnten in einigen Studien nachgewiesen werden, dass sich eine Endothelschicht auf den tissue-engineerten Klappen bildete, diese Schicht war aber in den meisten Fällen nicht über die gesamte Oberfläche verteilt [51,95].

Die Arbeitsgruppe LifeValve um Schmitt aus dem Deutschen Herzzentrum konnte bereits die Methode, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, etablieren. Sie implantierten drei Schafen über die V. Jugularis dTEHVs und untersuchten sie anschließend im zwölfwöchigen Follow-Up. Die Ergebnisse sowohl der Implantation, der Funktion und der histologischen Beurteilung waren sehr zufriedenstellend [96].

1.8 Schafsmodell

Das Schafsmodell hat sich im Bereich der Herzklappenforschung zum Goldstandard entwickelt [97,98]. Viele physiologische Parameter des Schafes, wie Blutdruck, Herzfrequenz, intrakardialer Druck und Herzzeitvolumen, entsprechen dem Menschen [99]. Auch anatomisch ähnelt das Herz, der Aufbau der Klappen und die Größenverhältnisse sehr denen des Menschen [100]. Als wesentlicher Unterschied ist zu nennen, dass der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt (RVOT) des Schafes deutlich länger ist als beim Menschen [100]. Schafen eignen sich außerdem sehr gut als Versuchstiere, da sie unkompliziert in der Haltung sind und ohne Probleme in größeren Gruppen gehalten werden können [101]. Sie lassen sich gut narkotisieren und intubieren. Durch den erhöhten Kalziummetabolismus und ausgeprägtere thrombogene und fibrogene Eigenschaften lassen sich im Schafsmodell innerhalb von kurzer Zeit schnelle Prognosen zur Verkalkung, Endothelialisierung und Fibrosierung der implantierten Endoprothetik treffen [102] [103].

2. Methodik

2.1 Tiere

Für den Versuch wurden insgesamt 18 weibliche Tiere verwendet, zwei weiße hornlose Schnucken und 16 graue gehörnte Heidschnucken im anhand des Zahnstatus geschätzten Alter zwischen drei und vier Jahren. Sie wurden im Zeitraum von Oktober 2013 bis Juni 2014 vom Landwirtschaftlichen Nutztierbetrieb Knoll aus Löwenberg, Deutschland, von dem Betrieb Laurenz aus Cottbus, Deutschland und der Züchter Drews aus Schönebeck, Deutschland, bezogen und in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité artgerecht und separat von anderen Versuchstieren gehalten. In der FEM, die nach EN DIN ISO 9001:2000 zertifiziert ist, wurden die Schafe durch Tierpfleger und Tierärzte betreut. Die Tiere erhielten für dieses Projekt folgende interne Nummerierung 51-58, 60-65, 72, 73, 75 und 100.

2.1.1 Schafsmodell

Bis auf den Gastrointestinaltrakt ähnelt die Anatomie, Physiologie und Biochemie des Schafes sehr dem Menschen, sodass sich die Forschungsergebnisse sehr gut übertragen lassen. Des Weiteren ist das Schaf bereits ein etabliertes Modell sowohl im Bereich des Tissue Engineerings als auch im kardiovaskulären Forschungsbereich. Sie sind günstig in der Anschaffung, pflegeleicht und gut zu narkotisieren.

2.1.2 Genehmigungen (Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo))

Für den Versuch wurden die Richtlinien der europäischen und deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde (FELASA, GV-SOLAS) beachtet. Der Antrag für das Projekt wurde bereits im Februar 2011, unter der Nummer G0111-11, vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) eingereicht und genehmigt.

2.1.3 Abbruchkriterien

Um den Tieren unnötiges Leid zu ersparen, wurden sogenannte „human endpoints“ festgelegt. In den ersten drei Tagen nach einem Eingriff wurde das Schaf täglich durch geschultes Personal untersucht. Vitalparameter (Herzfrequenz und Körpertemperatur), Wundheilung, Nahrungsaufnahme sowie soziales Verhalten wurden beurteilt. Falls erforderlich wurden weitere Untersuchungen wie z.B. Ultraschall durchgeführt. Es wurde ein Bewertungsbogen erstellt, der die

2. Methodik

Symptome in drei Kategorien unterteilte (A-C). Wenn das Tier gleichzeitig zwei Symptome der Gruppe A bzw. ein Symptom der Gruppe B aufwies, wurde es der/dem Tierarzt/in vorgestellt. Traten Symptome der Gruppe C auf, wurde das Tier, nach Rücksprache mit dem Tierarzt, unverzüglich und schmerzlos eingeschläfert.

Zeigte sich im MRT eine hochgradige Insuffizienz der Klappe (Regurgitationsfraktion (RF) > 30%) in zwei konsekutiven Untersuchungen wurde das Tier ebenfalls eingeschläfert.

2.2 Ablauf

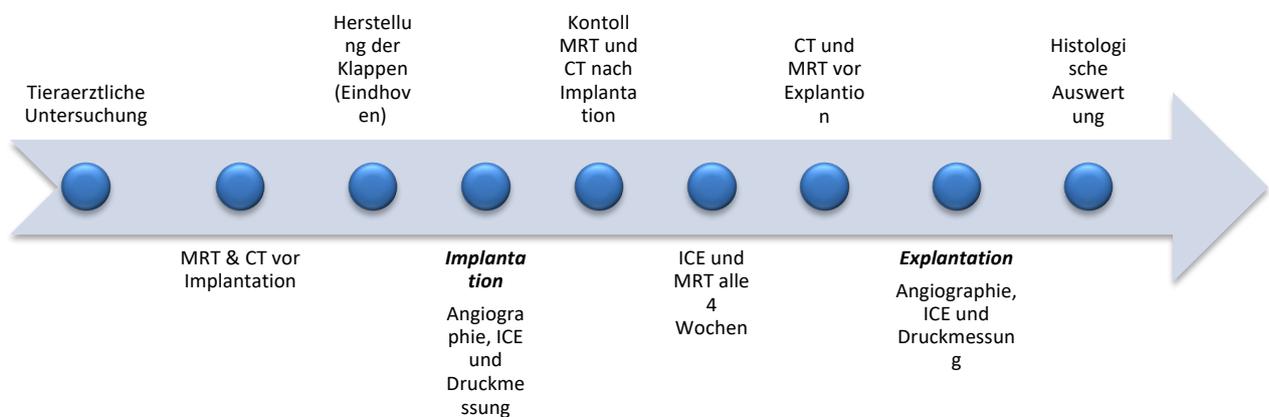


Abbildung 6: Ablaufschema des Projekts

Bevor die Tiere in den Versuch eingeschlossen wurden, wurden sie durch die Tierarzt/in des Projektes untersucht. Um Material für die Tissue-engineerte Herzklappe zu gewinnen, wurde einem Schaf exemplarisch, unter Narkose, eine 6cm Probe aus der V. jugularis interna entnommen. Vor der Implantation der dTEHV erhielten alle Schafe ein CT um zum einen die Größe des rechtsventrikulären Ausflusstrakts (RVOT) zu bestimmen, zum anderen um die Funktion der nativen Pulmonalklappe zu beurteilen. Direkt vor der Implantation erhielten die Tiere einen intrakardialen Ultraschall von der nativen, postinterventionell von der neuen Tissue-engineerten Pulmonalklappe. Außerdem erhielten sie eine invasive Druckmessung in der Pulmonalarterie und im Rückzug über der nativen und der implantierten Klappe. Die Implantation selbst erfolgte unter Röntgenkontrolle mittels C-Bogen (BV Pulsera, Phillips Healthcare, Eindhoven, Niederlande).

Sieben Tage nach dem Einsetzen der neuen Klappe wurden eine MRT- und eine CT-Untersuchung durchgeführt, um die Lage, Größe und Funktion zu bestimmen. Im weiteren Verlauf des Projekts erhielten die Schafe alle vier Wochen eine ICE- und MRT-Untersuchung. Vor der geplanten Explantation wurden ein letztes MRT und CT durchgeführt.

2. Methodik

Während der Explantation erhielten die Tiere, wie schon bei der Implantation, eine ICE, eine invasive Druckmessung und eine Angiographie.

Während der alle vier Wochen stattfindender Untersuchungen wurde, besonders auf die Regurgitationsfraktion an den implantierten Klappen im MRT und ICE geachtet. Überschritt dieser Wert 30%, in zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen, wurde das Tier zum nächsten Kontrolltermin eingeschläfert. Falls die Schafe diesen Wert bis zum Ende des geplanten Follow-Ups nicht überschritten hatten, wurden sie wie geplant während der Explantation eingeschläfert. Die Verweildauer der Klappen in den Tieren betrug zwischen acht Wochen und 52 Wochen.

2.2.1 Narkose, Monitoring und Euthanasie

Die Einleitung der Narkose erfolgte mit Midazolam (Dormicum®, Roche, Wien, Österreich) 0,4 mg/kg KG und Butorphanol (Alvegesic®, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) 0,4 mg/kg KG i.m. in den M. triceps brachii oder oberhalb der Hüfthöcker. Anschließend wurde ein intravenöser Zugang gelegt, über den die Sedierung mit Propofol (Propofol-Lipuro 1%®, Braun, Melsungen, Deutschland) 0,2-1,0 mg/kg KG und Ketamin (Ketamin-Actavis®, Actavis, München, Deutschland) 2-3,5 mg/kg KG erfolgte. Im Anschluss wurde das Tier intubiert. Für die ICE, CT und MRT Untersuchungen wurden Ketamin 3-15mg/kg KG/h und Propofol 6-12mg/kg KG/h über einen Perfusor verabreicht.

Für die Im- und Explantationen wurden Propofol 6-12mg/kg KG/h und Fentanyl (Fentanyl Janssen, Neuss, Deutschland) 0,005 –0,015mg/kg KG/h ebenfalls über einen Perfusor verabreicht, sowie über die IPPV-Beatmung mittels eines Beatmungsgerätes (Cato®, Dräger, Lübeck, Deutschland) Isofluran (Forene®, Abbott GmbH und Co KG, Wiesbaden, Deutschland) (1,2 - 2 %) + O₂ (5 l/min) + Air (1 - 2 l/min) verabreicht. Während der gesamten Narkose wurde das Tier mittels rektaler Temperatursonde, EKG und Pulsoxymeter überwacht. Die Augen wurden mit Bepanthen-Salbe (Bepanthen®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt. Die Euthanasie wurde mit Propofol 10mg/kg KG i.v. und Kaliumchlorid 7,45% 1 ml/kg KG i.v. durchgeführt.

2.2.2 Lagerung und OP-Vorbereitung

Während der Implantation und Explantation lag das Tier auf dem Rücken und wurde an den Läufen fixiert. Anschließend wurde es in der Leiste, am Thorax sowie am Hals rasiert, entfettet

2. Methodik

und mit Jod desinfiziert. Danach mit einer Vakuummatratze stabilisiert, mit Wärmefolie eingepackt und zugedeckt und die Zugangsbereiche steril abgedeckt. Für die MRTs und CTs wurde das Schaf in Bauchlage gelagert und mit einer Halterung fixiert.

2.2.3 Implantation

Die Implantation der tissue-engineerten Pulmonalklappe wurde minimalinvasiv über die V. jugularis durchgeführt. Hierfür wurde die Vene punktiert und mittels Dilatoren (Edwards Lifescience Corporation, Irvine, USA) auf 26 Fr oder 32 Fr dilatiert. Parallel zur Dilatation wurde die Klappe radial gefaltet und anschließend mit dem Ablagesystem über einen Führungsdraht (Amplatz Ultra Stiff, Cook Medical, Bloomington, USA) eingeführt, unter Durchleuchtung mittels C-Bogen (BV Pulsera, Phillips Healthcare, Eindhoven, Niederlande) wurde sie in die richtige Position gebracht und über die native Pulmonalklappe implantiert. Dabei wurden die Taschen der nativen Pulmonalklappe an die Gefäßwand gepresst und hatten keinen Kontakt mehr zum Blutstrom. Nach erfolgreicher Implantation wurde die korrekte Lage mittels Angiografie und Echokardiografie (ICE) kontrolliert, sowie die Funktion der Klappe beurteilt. Anschließend wurden die Schleusen entfernt und die V. jugularis mit einer Tabakbeutelnaht vernäht.

2.2.4 Intrakardiale Echokardiographie (ICE)

Bei der intrakardialen Echokardiographie wurde in die punktierte V. jugularis eine Schleuse von 9-11 Fr gelegt, hierrüber wurde ein Katheter (AcuNac, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) mit Ultraschallsonde (GE Healthcare, Tirat Carmel, Israel) eingeführt und bis zum Herzen vorgeschoben. Hier wurden folgende Aufnahmen der Trikuspidal- und Pulmonalklappe gemacht: 2-dimensionale Graustufen Videoschleife (2D-greyscale cineloop), CW- und PW-Doppler sowie eine farbkodierte Flussdarstellung (colorflow cineloop). Des Weiteren wurden die Klappen mittels „Proximal isovelocity surface area“ (PISA), „vena contracta“ (VC) und Insuffizienzjets beurteilt. All diese Werte beschreiben den Insuffizienzgrad einer Klappe, den man in leicht-, mittel- und hochgradig unterteilt. Die Vena contracta ist definiert als die schmalste Stelle, an der die höchste Flussgeschwindigkeit herrscht. Bei der PISA handelt es sich um ein Phänomen, das auftritt, wenn die Klappe nicht mehr komplett schließt. An der distalen Seite der Klappe entsteht während der Diastole durch zurückfließendes Blut eine halb-

2. Methodik

kugelförmige Flusskonvergenzzone, die sich mittels Doppler darstellen lässt. Anhand des Radius der Halbkugel lässt sich das Regurgitationsvolumen und die EROA (effective regurgitation orifice area) berechnen [104,105].

2.2.5 Computertomographie (CT)

Ziel der CT-Untersuchung war die Vermessung der Pulmonalarterie, der Größe der Pulmonalklappe, sowie der Form und Größe des Stents. Das CT (Siemens Somatom Definition AS 64, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) wurde EKG getriggert gefahren mit einer Schichtdicke von 0,75 mm. Zur besseren Beurteilung und klaren Abgrenzung des umliegenden Gewebes, wurde Kontrastmittel 2-2,5 ml über einen Kontrastmittelinfusomaten (Imeron 400 MCT, Bracco Imaging GmbH, Konstanz, Deutschland) verabreicht. Anschließend wurden die Daten mit dem Programm Syngo VE31H Software (Siemens AG, Erlangen, Deutschland) ausgewertet.

2.2.6 Magnetresonanztomographie (MRT)

In der alle vier Wochen durchgeführten Kontrolle wurden folgende Aspekte untersucht: Ejektionsfraktion (EF), Füllungszustand des rechten Ventrikels und die Flusssequenz (Q-Flow) direkt am Ausflusstrakt der Pulmonalarterie. Die EF berechnet sich aus dem Schlagvolumen dividiert durch das enddiastolische Volumen multipliziert mit 100 und wird in Prozent angegeben. Das Schlagvolumen berechnet sich durch die Differenz zwischen enddiastolischem und endsystolischem Volumen im linken Ventrikel. Die EF wird in % angegeben und beträgt beim gesunden zwischen 60-70%. Bei der Regurgitationsfraktion (RF) handelt es sich um den Quotienten aus Regurgitationsvolumen und Auswurfvolumen und dient zur Einschätzung des Schweregrades der Insuffizienz. Für die Auswertung der Messdaten wurde die Standardsoftware der Firma Philips und das Programm cvi42 (Circle Cardiovascular Imaging Inc. Canada) verwendet.

2.2.7 Angiografie

Die Angiografie wurde in den Follow-up Untersuchungen zum Vermessen des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (RVOT), des Bulbus, der Pulmonalklappe und des supraavalvulären Durchmessers in der Diastole und Systole genutzt. Während der Implantation der dTEHV wurde ebenfalls eine Angiografie durchgeführt, dies ermöglichte eine ideale Positionierung des Stents. Hierfür wurde ein C-Bogen (BV Pulsera, Philips Healthcare, Eindhoven, Niederlande)

2. Methodik

Schaf einen Bolus Heparin (Heparin Natrium 5000-Ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) 100 I.E./kg KG, um insbesondere die intrakardiale Blutgerinnung zu unterbinden. Nach Feststellung des Todes durch eine Tierärztin (Nulllinien EKG, Sättigungsabfall bei Beenden der Beatmung und Verlust von Reflexen) wurde der Thorax eröffnet und das Herz mit Perikard entfernt und präpariert. Das tote Tier wurde fachgerecht entsorgt.

2.3 Verwendetes Material und Geräte

2.3.1 Herzklappen

Die Klappen wurden durch den Projektpartner Xeltis-BV in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Eindhoven hergestellt. Insgesamt wurden vier verschiedene Gruppen von Klappen hergestellt. In der ersten und zweiten Gruppe wurden die Zellen sofort auf den Scaffold gegeben, in der zweiten Gruppe wurde die Form des Scaffolds angepasst, in der dritten Gruppe wurden die Zellen erst nach zehn Tagen auf den Scaffold gegeben und in der letzten erst nach 13 Tagen (s. Tabelle 3).

| Gruppe | Klappe | Schaf | Scaffold | Serum | Stentlänge | Material | Insert |
|--------|--------|-------|----------|-------|------------|----------|--------|
| n.a. | 5.9 | 51 | V3 | 0,1% | 40mm | PGA | 0d |
| 1 | 5.2 | 52 | V3 | 0,1% | 40mm | PGA | 0d |
| 1 | 5.3 | 53 | V3 | 0,1% | 40mm | PGA | 0d |
| 1 | 5.4 | 54 | V3 | 0,1% | 40mm | PGA | 0d |
| 1 | 5.6 | 55 | V3 | 0,1% | 40mm | PGA | 0d |
| 1 | 5.7 | 56 | V3 | 0,1% | 40mm | PGA | 0d |
| n.a. | 7.6 | 72 | V4 | 1% | 30mm | PGA | 0d |
| 2 | 8.5 | 57 | V4 | 0,1% | 30mm | PGA | 0d |
| 2 | 8.2 | 58 | V4 | 0,1% | 30mm | PGA | 0d |
| 2 | 9.3 | 61 | V4 | 0,5% | 30mm | PGA | 0d |
| 2 | 9.4 | 63 | V4 | 0,5% | 30mm | PGA | 0d |
| n.a. | 9.2 | 60 | V4 | 0,5% | 30mm | PGA | 10d |
| 3 | 12.4 | 64 | V4 | 1% | 30mm | PGA | 10d |
| 3 | 12.5 | 65 | V4 | 1% | 30mm | PGA | 10d |
| 4 | 19.5 | 62 | V4 | 1% | 30mm | PGA | 13d |
| 4 | 19.1 | 73 | V4 | 1% | 30mm | PGA | 13d |
| 4 | 19.4 | 75 | V4 | 1% | 30mm | PGA | 13d |
| 4 | 19.3 | 100 | V4 | 1% | 30mm | PGA | 13d |

Tabelle 3 Übersicht der Klappenherstellung.

Die unterschiedlichen Herstellungsverfahren wurden in den Farben grün, rot, blau und gelb markiert. Die Tiere 51, 60 und 72 wurden keiner Gruppe zugewiesen, da sie verstarben bzw. die native Klappe nicht überstentet wurde.

2.3.1.1 Probenentnahme

Um eine autologe Herzklappe herstellen zu können benötigt man tierspezifische, vaskuläre Zellen. Unter Narkose wurde einem Schaf exemplarisch ein ca. 6cm langes Stück der V. jugularis interna entfernt, die offenen Gefäßstücke wurden vernäht und die Wunde verschlossen. Die entnommene Probe wurde mit PBS (Gibco, Darmstadt, Deutschland) gereinigt, Blutreste entfernt und in einem Nährmedium (Medium-199, Gibco, Paisley, Schottland) konserviert und über Nacht gekühlt nach Eindhoven verschickt.

2.3.1.2 Scaffold

Bei einem Scaffold handelt es sich um ein vorgefertigtes Gerüst, welches dem Gewebe die Form einer Pulmonalklappe vorgeben soll. Bei diesem Projekt wurde für die Herstellung des Scaffolds, ein Polyglykolsäure (PGA, Gewicht $70\text{mg}/\text{cm}^3$, Schichtdicke 1mm, Cellon S.A., Beireldange, Luxemburg) verwendet (s. Abb. 8).

Anschließend wurde eine Schicht 1,75% Poly-4-Hydroxybutyrat (P4HB, TEPHA Inc., Lexington, USA) verdünnt mit Tetrahydrofuran (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) aufgetragen. Ein Scaffold sollte idealerweise aus bioresorbierbarem Material bestehen und nur so lange vorhanden sein, bis die neu besiedelten Zellen sich im Gewebsverbund selbst tragen und stützen können.

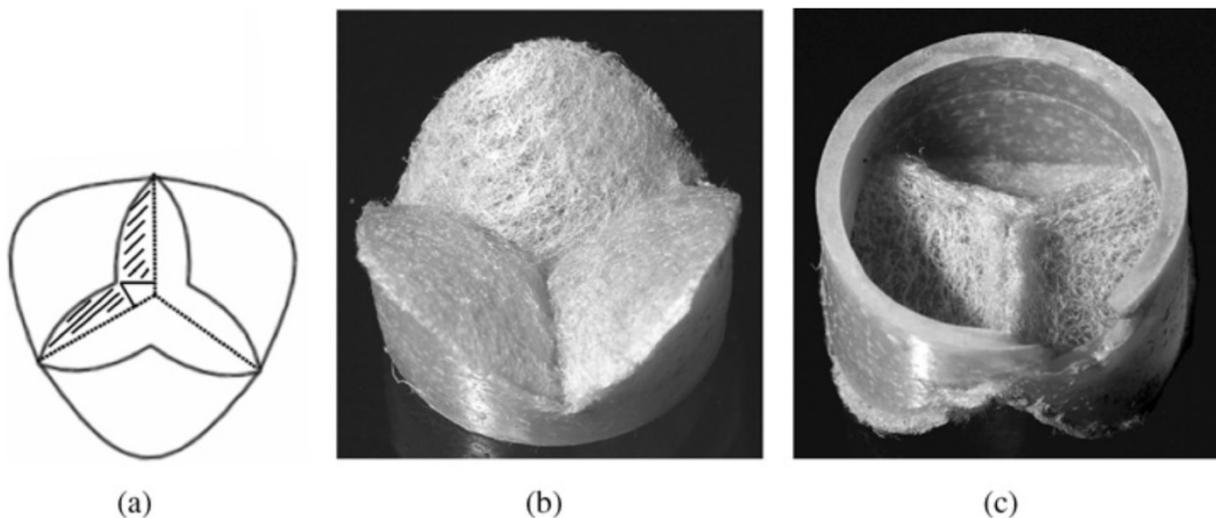


Abbildung 8: Scaffold

a) Schematische Darstellung des Scaffolds mit seinen drei Taschen, b) Ansicht von unten auf einen PGA Scaffold mit P4BH Mantel, der Durchmesser beträgt 23mm c) Ansicht von oben. (Mol et. al. 2005) [85]

2.3.1.3 Stent

Nach diesen Schritten wurde der fertige Scaffold mittels nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene 4-0, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit dem selbstexpandierenden Nitinolstent (PFM Medical AG, Köln, Deutschland) vernäht. An der Ober- und Unterkante wurde jeweils eine fortlaufende Naht angebracht, während in der Mitte des Stents mehrere versetzte Einzelnähte gesetzt wurden, um die Klappe in dem Stent zu befestigen (s. Abb. 9 Bild 3). Der Stent hatte die Maße 40 mm Länge x 30 mm Durchmesser in der Gruppe 1 bzw. 30 mm x 30 mm in den Gruppen 2-4.

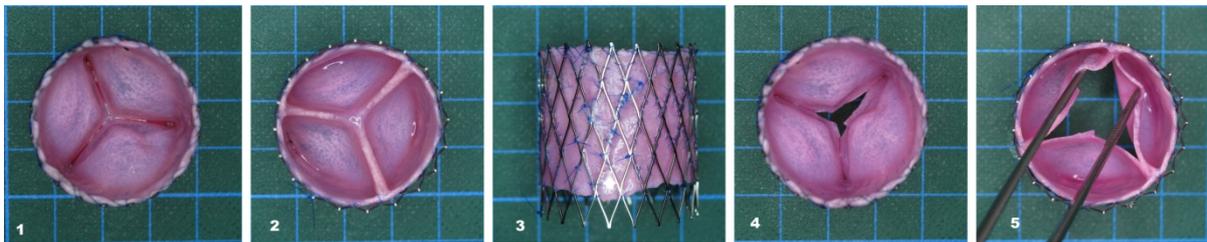


Abbildung 9: fertige Klappe vor Implantation

Hier ist die fertige Klappe des Schafs Nummer 56 zu sehen, vor Implantation und im ungerimpften Zustand. 1) Klappe von ventrikulär 2) Klappe von arteriell 3) seitliche Ansicht 4) aufgetrennte Taschen von unten 5) aufgehaltene Taschen von oben

2.3.1.4 Herstellung der Herzklappe

Die Zellprobe wurde mit DMEM Advanced (Gibco, USA), 10% Schafsserum (Gibco, USA), 1% GlutaMax (Gibco, USA) und 0,1% Gentamycin (PAN Biotech, Deutschland) vermischt und anschließend mit einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro cm^2 auf den Scaffold aufgetragen. Anschließend wurde der Scaffold in einen speziellen Bioreaktor (Diastolic Pulse Duplicator System) (s. Abb. 10) gelegt, in dem er von einem Nährmedium ((DMEM Advanced, angereichert mit 0.1% Lammserum, 1% GlutaMax, 1% Penicillin-Streptomycin und L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (0.25 mg/ml; Sigma-Aldrich)) umgeben war. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht. In diesem Reaktor befand sich die Klappe für vier Wochen. Das Besondere an diesem Reaktor ist, dass dort ständig ein Druckgradient von der arteriellen Seite herrschte. Dieser Druckgradient betrug ab dem ersten Tag, 3mmHg und wurde im Laufe der Tage fortlaufend erhöhte, bis er am fünften Tag, 15mmHg erreichte hatte. Dieser Druck wurde bis zum Ende der vier Wochen beibehalten. Die Taschen der Klappen waren zum Zeitpunkt der Herstellung miteinander verwachsen und wurden erst kurz vor der Implantation mit einem Skalpell im OP aufgetrennt (s. Abb. 9 Bild 4).

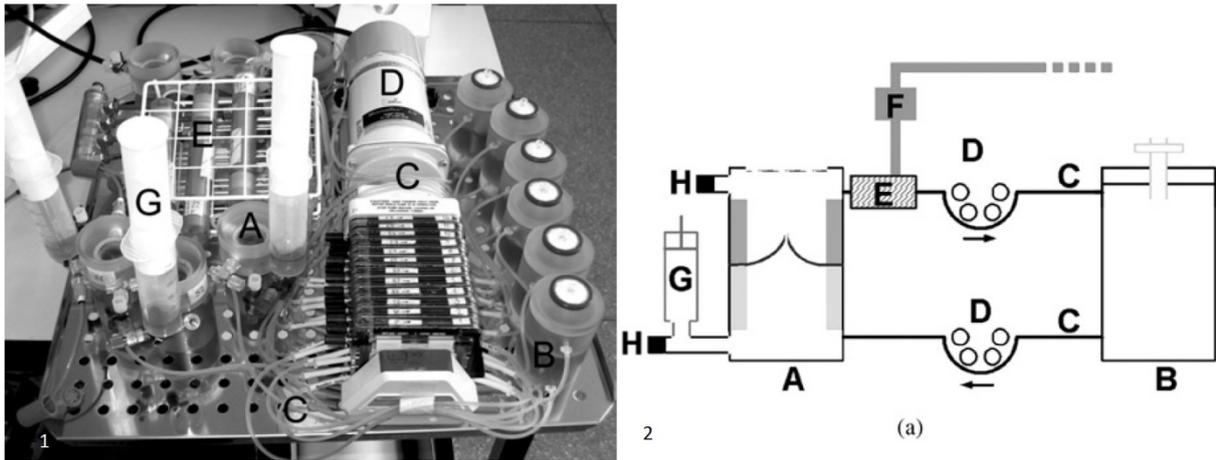


Abbildung 10: Bioreaktor

Bild 1) Foto des Diastolic Pulse Duplicator Systems (DPD), Bild 2) Schematische Darstellung. A Bioreaktor, B Mediumbehälter, C Schlauchverbindungen, D Rollenpumpe, E Polycarbonat-Zylinder, F Magnetventil, G Spritze, H Drucksensor Mol et al. [85]

2.3.1.5 Dezellularisierung

Nachdem der Herstellungsprozess abgeschlossen war, wurden die Klappen dezellularisiert. Hierfür wurden die Klappe mit PBS ausgewaschen und daraufhin über Nacht in eine Lösung aus PBS, 0,25% Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Deutschland, 0,25% Natriumdesoxycholat (SD, Sigma Aldrich) und 0,02% EDTA (SD, Sigma Aldrich), gelegt und bei 37°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurden die TEHV wieder mit PBS ausgewaschen. Um Zellreste zu entfernen, wurde eine Verdauungslösung aus 50mM TRIS-HCl Puffer (Tris, Merck) und Benzonase (25 Einheiten/µl, Novagen, Madison WI, USA) verwendet.

Anschließend wurden im dritten Schritt die Herzklappe wieder mit PBS gespült und für mindestens 24 Stunden in Medium-199 bei 4 °C gelegt. Dann wurde die Klappe noch einmal mit PBS gewaschen und in 70% Ethanol für 30 Minuten egelegt.

Zum Schluss wurde die Klappe ein letztes Mal in sterilem PBS gebadet, steril verpackt, gekühlt und über Nacht an das Deutsche Herzzentrum Berlin verschickt.

2.3.2 Katheter

Eigens für den Versuch wurde ein spezieller Katheter (Abb. 11) entwickelt. Dieser besteht grob aus drei Teilen: Handgriff, Innen- und Außenkatheter und einer Spitze. Durch Drehen des Handgriffs wird der Außenkatheter zurückgezogen und damit der zusammengefaltete Stent, der sich in der Kammer vor der Spitze befindet, freigegeben.

2. Methodik

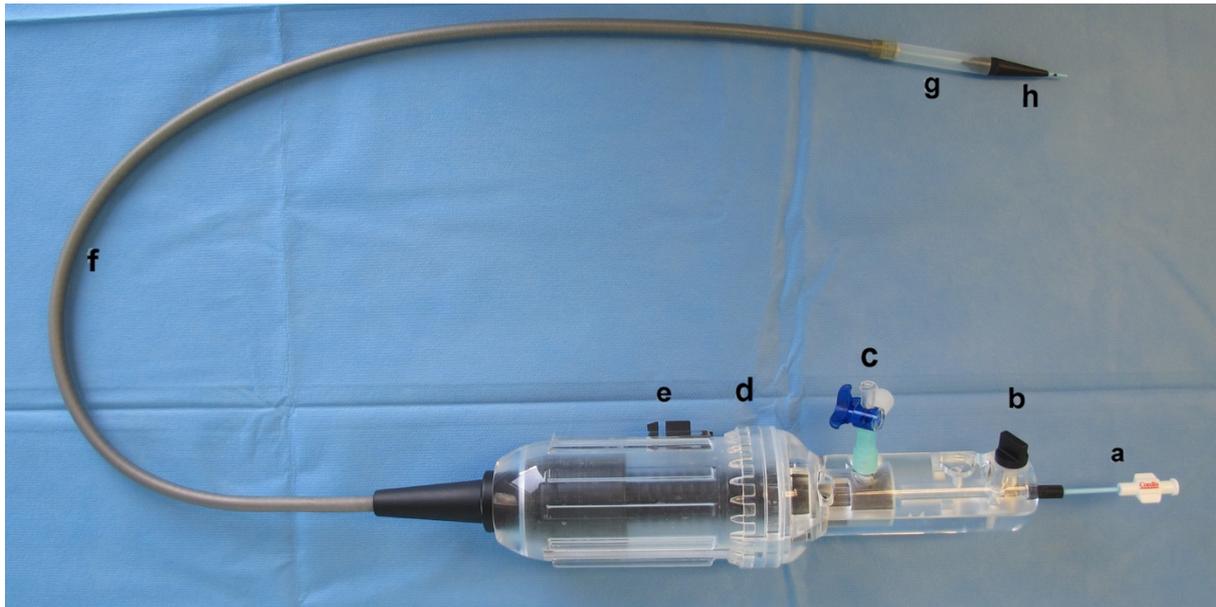


Abbildung 11: Gesamtbild des Katheters

a) Aufnahme des Führungsdrahts b) Feststellschraube c) Spülaufsatz d) Handgriff, mit Rotationssystem e) Sicherung f) Außen- und Innenkatheter g) Kammer für den Stent h) Spitze

Der Außenkatheter (als Auftragsarbeit hergestellt durch Vistamed innovative catheter solutions, Carrick-on-Shannon, Irland) besteht aus drei Schichten. Die äußere Schicht besteht aus zwei unterschiedlich thermoplastischen Elastomeren: im distalen Teil wurden weichere Elastomere als im proximalen Teil verbaut, dies ermöglicht ein gutes Einbringen des Katheters und durch die elastische Spitze lässt sich der Katheter zielgerecht über einen sterilen Führungsdraht (Amplatz Ultra Stiff, Cook Medical, Bloomington, USA) lenken. Die mittlere Schicht des Außenkatheters besteht aus einem Metallgeflecht, welches ihm Stabilität gegenüber Längung verleiht. Bei der inneren Schicht handelt es sich um eine Teflonschicht, wodurch die Reibung zwischen Innen- und Außenkatheter reduziert werden soll.

Eingebracht wurde das Ablagesystem über einen Führungsdraht (Amplatz Ultra Stiff, Cook Medical, Bloomington, USA).

Je nachdem wie gut sich die Klappe crimpen (s. Crimping) ließ, wurden verschiedene Kammern verwendet. Diese Kapseln hatten einen Außendurchmesser von 8,6 mm (26 Fr) bzw. 10,6 mm (32 Fr).

Innerhalb des Außenkatheters wurde ein 4 Fr Multipurpose Katheter (Cordis Corporation, Bridgewater, USA) eingeführt. Am Ende dieses Katheters befindet sich eine elastische Spitze (Speedpart GmbH, Hasloch Main, Deutschland), welche das Innere der Gefäße vor Verletzungen schützen soll.

2. Methodik

Der Innenkatheter besteht aus einer Spirale (Shannon Coiled Springs, Limerick, Irland). Sie dient als Anschlag für den Stent und ermöglicht so das Ablegen der Klappe [106].

2.3.3 Crimping

Um die 30 mm durchmessende Klappe, inklusive Stent, implantieren zu können, musste sie zirkulär zusammengefaltet und in den Katheter geladen werden. Hierfür benötigt man ein Crimping Tool (Edwards Lifescience Corporation, Irvine, USA). Die bereits in den Stent eingnähte Klappe wurde in das Gerät eingelegt und durch gleichmäßigen radialen Druck auf eine Größe von 8-10mm zusammengerollt (s. Abb. 12). Anschließend wurde sie in das Ablagesystem des Implantationskatheters eingeschoben (s. Abb. 13).



Abbildung 12: Crimping

Exemplarisches Crimping der Klappe Nummer 56, von links nach rechts ist deutlich zu sehen wie sich der Durchmesser von 30mm auf 10mm verringert.

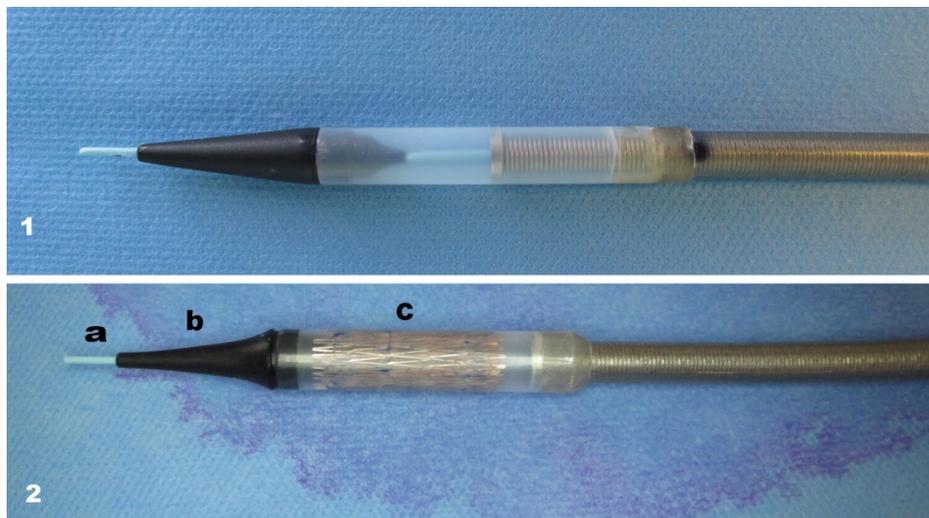


Abbildung 13: Ablagesystem

Bild 1) Katheter ohne Stent. **Bild 2)** Implantationskatheter mit gecrimpter Stentklappe. **a** Spitze des Innenkatheters **b** die schwarze „Olive“ formt die Katheterspitze **c** gecrimpte Klappe. Auch hierbei handelte es sich schon wie in der Abb. oben um die Klappe des Tieres 56.

2.4 Makroskopie

Nach der Explantation des Herz-Lungen-Pakets wurde nach einem festgelegten Ablaufschema das Herz präpariert, vermessen und fotodokumentiert. Als Erstes wurde das Perikard präpariert und untersucht, ob sich ein Erguss gebildet hatte, oder sich Anzeichen für eine Perikarditis zeigten. Anschließend wurde das Herz mit steriler Kochsalzlösung ausgewaschen, die Ventrikel mit einer Schere eröffnet und begutachtet. Danach wurde die Klappe samt Stent herausgeschnitten und untersucht. Hier wurde vor allem nach Thromben in der Hinge-Region (tiefste Stelle der Tasche) gesucht sowie nach Entzündungszeichen oder Nekrose an der Klappe. Außerdem wurde beurteilt, ob sich ein neues Endothel gleichmäßig auf der Klappe verteilt hatte und ob die Taschen der Klappe an der Wand verwachsen waren. Nach Abschluss der Vermessung und Fotodokumentation wurde die Klappe nach dem unten gezeigten Schnittmuster mit einer Schere zugeschnitten (s. Abb. 14) und in 4 % Formaldehyd konserviert.

2.5 Histologie

2.5.1 Schnitte

Die aortales Segel der Pulmonalklappe wurde nach der Explantation in drei Teile (s. Abb. 14) geschnitten, anschließend in 4% Formaldehyd konserviert und verschickt. Einen Teil erhielt die Pathologische Abteilung des Deutschen Herzzentrums Berlins (DHZB), ein weiterer ging an die Universität Göttingen, das dritte wurde als Reserve in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die beiden anderen Taschen wurden in PBS, 4% Formaldehyd, oder 2% Glutaraldehyd fixiert und gingen an die Projektpartner der Universität Zürich und Eindhoven.

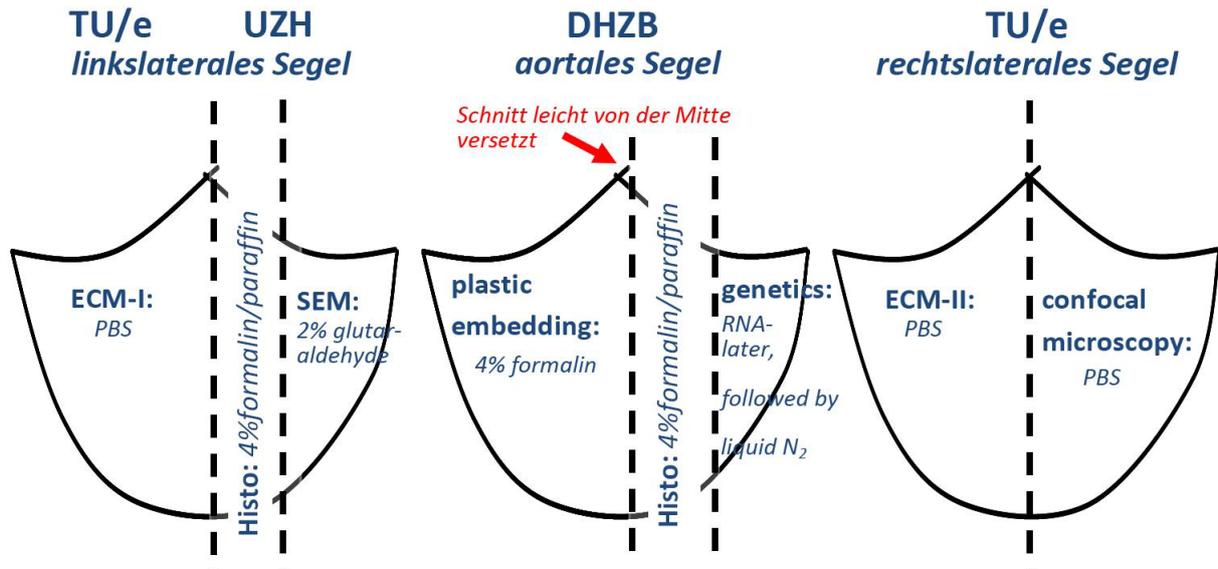


Abbildung 14: Schnittmuster der explantierten Pulmonalklappe

2.5.2 Plastic embedding

Um ein Ablösen des Stents und der damit verbundenen Grenzschicht zwischen Graft und Host zu vermeiden wurde das Präparat in Göttingen zunächst in Kunstharz (Methylmethacrylat) fixiert und anschließend mit einer Diamantbandsäge (300CP, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) mittels der Säge-Schleif-Technik nach Donath und Breuner geschnitten [107]. Mit diesem Verfahren konnten 200 µm starke Schnitte angefertigt werden. Anschließend wurden die Präparate durch ein Mikroschleifsystem (400CS, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) auf ca. 20 µm herunter geschliffen und mit feinem Schleifpapier poliert. Das Besondere an diesem Verfahren ist, dass die Metalteile des Stents nicht entfernt werden müssen und sich so das Einwachsverhalten oder die Interaktion zwischen Stent und Gewebe sehr gut beurteilen lässt.

2. Methodik

| Primary Antibody | Dilution | Antigen retrieval | Secondary antibody |
|---|----------|---|--|
| Mouse anti-human smooth muscle actin, clone 1A4 (Dako) | 1:50 | Citrate buffer, pH 6, 40 min in a steamer | Rabbit anti-mouse immunoglobulin antibody (Dako), diluted 1:100 |
| Polyclonal rabbit anti-human von Willebrand factor (Dako) | 1:400 | Citrate buffer, pH 6, 40 min in a steamer | Swine anti-rabbit immunoglobulin antibody (Dako), diluted 1:100 |
| Polyclonal rabbit anti-human-CD3 (Dako) | 1:100 | Citrat ph 6 (Dako), 40 min in a steamer | Polyclonal rabbit anti-goat immunoglobulin/horseradishperoxidase (Dako), diluted 1:100 |
| Monoclonal mouse anti-human CD79 α cy, clone HM57 (Dako) | 1:100 | Tris/EDTA, ph 9, 20 min in a steamer | Rabbit anti-mouse immunoglobulin (Dako), diluted 1:100 |

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Färbung

2.5.3 Färbungen

Nach dem Polieren wurden die Präparate mit der Richardson Blue (Standardfärbung) gefärbt. Des Weiteren wurden immunhistochemische Färbung angefertigt (s. Tabelle 4). Für diese Methode wurden die Präparate auf Glas aufgebracht und mit Hämalaun gegengefärbt. Danach konnten die Antikörper aufgetragen werden. Es folgte exemplarisch an drei Präparaten eine Färbung auf Kalkablagerungen (van-Kossa) und eine Movat Pentachrom Färbung (s. Tabelle 5)

2. Methodik

| Färbung | Eigenschaften |
|------------------------------------|--|
| Richardson | Basophile und osmiophile Strukturen blau Metachromatische Substanzen rotviolett |
| Elastika-van-Gieson | Zellkerne: schwarzbraun Zytoplasma: gelb-leicht bis bräunlich Kollagenfasern: rot |
| CD3 | Thymozyten und reife T-Lymphozyten |
| CD 68 | Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Basophilen und großen Lymphozyten |
| CD79 | B -Lymphozyten |
| Von Willebrand Faktor (vWF) | Endothel: bräunlich, Zellkerne: blau |
| α SMA | Antikörper gegen Aktin, glatte Muskelzellen: rosa-rot |
| Movat Pentachrom | Zellkerne und elastische Fasern: schwarz Glykoproteine, EZM : blau Kollagen, retikuläre Fasern: gelb Fibrin: hell-rot, Muskelzellen. dunkel-rot |
| Hämatoxylin-Eosin (HE) | Zellkerne: blau-violett Zytoplasma: rot bis blauviolett Kollagenfasern: rot Elastische Fasern: ungefärbt bis rosa |
| Van-Kossa | Kalk: schwarz übriges Gewebe: goldgelb und rötlich |
| Vimentin | Vimentin ist ein Zytoskelettprotein von mesenchymalen Zellen (Fibroblasten, Chondrozyten, Osteozyten, Endothelien und weiße Blutkörperchen) |

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Färbungen für die Histologie mit ihren Färbereigenschaften

2.5.4 Auswertung

Die histologische Beurteilung erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Leica DM LB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) durch das Labor von Prof. Sigler in Göttingen. Anschließend wurden die Bilder für die virtuelle Mikroskopie mittels eines Scanning-Mikroskops (Olympus BX51, Dotslide-System Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland) digital archiviert, Anschließend konnten die eingescannten Präparate mittels einer Software (OlyVIA 2.4, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland) ausgewertet werden. Für die Bildauswahl wurden die Bilder mit Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) zugeschnitten, beschriftet und als Collage abgespeichert.

Anhand eines 10-Punkte-Schemas wurden die Klappen dann beurteilt.

1. Struktur und Stärke der Klappentasche
2. Vorhandensein von Kollagen und Elastin im Graft
3. Ausmaß der Lokalisation von Re-Endothelialisierung und einer Neointima
4. Apposition des Scaffolds an die Pulmonalarterienwand
5. Einwachsen des Stents zwischen Scaffold und Pulmonalarterienwand

2. Methodik

6. Lokalisation und Ausmaß einer Fremdkörperreaktion
7. Vorhandensein von Verkalkung
8. Oberflächliche Auflagerung, besonders in der Hinge-Region der Taschenklappe
9. Ausmaß der Neovaskularisierung
10. Anhaltspunkte für Nekrose der Pulmonalarterienwand

2.6 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden Microsoft Excel (Microsoft Office 2010, USA) und SPSS (IBM SPSS Statistics 19, USA) verwendet. Tabellen und Diagramme wurden mit Microsoft Word (Microsoft Office 2010, USA) erstellt. Als statistisch signifikant wurde P im Signifikanzintervall von kleiner als 0,05 (95%) betrachtet. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

2.7 Literaturrecherche

Für die Literaturrecherche wurden die Datenbanken von Pubmed Medline und Google Scholar verwendet. Diese wurden systematisch mit ausgewählten MeSH (Medical Subject Headings) durchsucht und mit verschiedenen Booleschen Operatoren (AND, OR, NOT) kombiniert, um das Suchgebiet einzugrenzen und genauere Ergebnisse zu erzielen. Eingeschlossen wurden Studien, in der Online-Bibliothek der Charité bzw. des DHZB als Volltext, in englischer oder deutscher Sprache verfügbar waren. Anhand des Titels und des Abstracts wurde eingeschätzt, ob die Arbeiten zum Thema passten und dann anhand des Volltextes bewertet. Zudem wurden die Literaturverzeichnisse in Volltexten auf weitere potenziell interessante Arbeiten hin untersucht. Des Weiteren wurden Bücher aus der medizinischen Bibliothek der Charité verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Tiere

Das Gewicht der Schafe vor dem Eingriff belief sich auf $43,7 \pm 5,3$ kg und nahm im Laufe der Studie bis zur Explantation auf $46,2 \pm 9,7$ kg zu. Vor der Implantation der neuen Klappe erhielten die Tiere ein CT zur Größenbestimmung der Pulmonalklappe und der angrenzenden Strukturen. Der Durchmesser der Klappe betrug im Mittel $21,60 \text{ mm} \pm 1,64 \text{ mm}$ (s. Tabelle 6).

| (alle Angaben in mm) | Mittelwert | Minimum | Maximum | Umfang |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| RVOT | $21,51 \pm 1,70$ | $16,22 \pm 2,10$ | $26,79 \pm 2,14$ | $71,20 \pm 5,41$ |
| Pulmonalklappe | $21,60 \pm 1,64$ | $17,98 \pm 2,36$ | $25,22 \pm 1,70$ | $72,89 \pm 5,56$ |
| 2cm distal der Klappe | $25,42 \pm 2,05$ | $22,71 \pm 2$ | $28,14 \pm 2,52$ | $79,55 \pm 19,07$ |
| Supravalvulär | $25,46 \pm 2,07$ | $22,83 \pm 1,96$ | $28,09 \pm 2,50$ | $83,31 \pm 5,93$ |

Tabelle 6: CT-Daten der nativen Pulmonalklappe und ihrer angrenzenden Strukturen.

3.2 Implantation

Insgesamt wurden 18 Tiere für den Versuch verwendet. Die folgenden drei Tiere wurden aus dem Follow-Up ausgeschlossen.

Tier 72 bekam kurz nach Implantation der neuen Klappe Kammerflimmern und konnte trotz Reanimation nicht wiederbelebt werden. Tier 51 erhielt während der Implantation versehentlich eine Überdosis Heparin zur Antikoagulation, daraufhin entwickelte es innere Blutungen und wurde nach zwei Wochen eingeschläfert. Bei dem Schaf mit der Nummer 60 wurde die tissue-engineerte Klappe zu weit proximal implantiert, sodass die native Pulmonalklappe erhalten blieb. Aufgrund der unphysiologischen Strömungsverhältnisse wurde Tier 60 aus den Anschlussuntersuchungen ausgeschlossen.

Bei den Tieren 52, 54 und 56 wurde die Klappe wahrscheinlich beim Crimping oder beim Entfernen des Ablagesystems beschädigt. In der echokardiografischen Untersuchung zeigte sich ein erhöhter Rückfluss durch die Pulmonalklappe. Daraufhin wurden die Klappen bereits nach acht bzw. neun Wochen explantiert. In der makroskopischen Beurteilung waren Löcher oder beschädigte Taschen zu sehen.

Alle weiteren Follow-Up Untersuchungsergebnisse beziehen sich folglich auf die 15 verbleibenden Tiere.

3. Ergebnisse

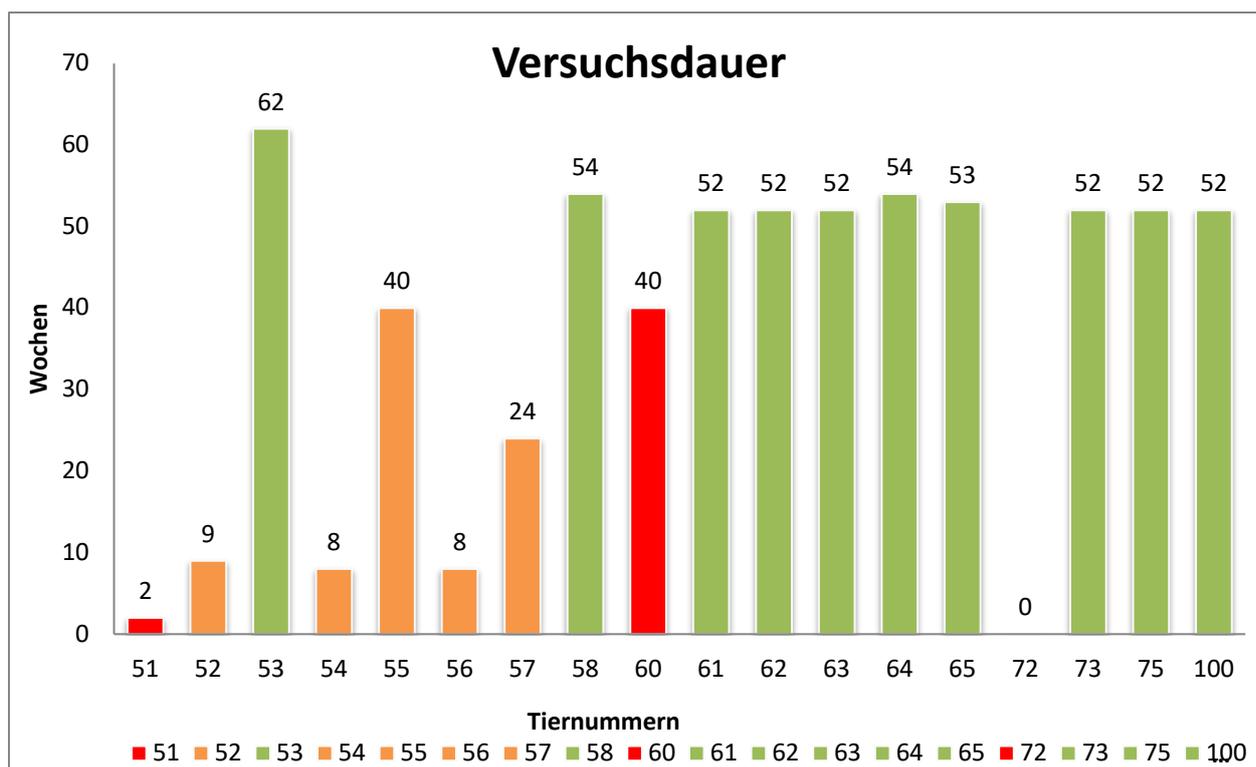


Diagramm 1: Versuchsdauerübersicht

Versuchsdauer der Tiere zwischen Implantation und Explantation. In grün sind alle Tiere markiert, die das Ziel von 52 Wochen erreicht haben, in orange alle implantierten Klappen, die beschädigt wurden oder eine schlechte RF hatten, in rot alle Tiere, die bei der Implantation oder kurz darauf verstarben.

Bei einigen Tieren wurden während der Ablage der tissue-engineerten dezellularisierten Herzklappe bzw. beim Einführen des Ablagesystems, Extrasystolen beobachtet, diese waren aber in den meisten Fällen selbstlimitierend und somit auch hämodynamisch irrelevant. Außer bei Tier 72, das unmittelbar nach der Ablage der Klappe Kammerflimmern bekam.

Ein weiteres Problem nach der Ablage der Klappe ergab sich beim Zurückziehen des Ablagesystems, da sich die Spitze des Katheters (Abb. 11, h) nicht zurückziehen lies. In zwei Fällen (Tier 54 und 56) kam es zu einem Verhaken der Spitze. In der anschließenden intrakardialen Echokardiographie zeigten sich ein zurückschlagendes Segel bzw. ein eingerissenes Segel. Bei den Tieren 55, 57 und 100 verhakte sich die Spitze des Ablagesystems ebenfalls, dabei wurden aber in den anschließenden Untersuchungen keine Beschädigungen der Taschen festgestellt.

Ziel war es die native Pulmonalklappe komplett zu überstenten, sodass sie keinen hämodynamischen Einfluss mehr auf den Blutkreislauf haben kann. Dies gelang in 16 von 18 Fällen (89%). Bei den Tieren 51 und 60 rutschte die dTE-Herzklappe zu weit nach distal in Richtung Pulmonalarterie und die native Pulmonalklappe blieb erhalten. Bei den 16 anderen Tieren

3. Ergebnisse

konnte die Klappe so implantiert werden, dass die native Klappe keinen Einfluss mehr auf den Blutfluss nahm.

| Tier | Dauer (Anlage erste Schleuse bis Entfernen letzte Schleuse) | Dauer (Crimping bis Ablage) | Kommentar |
|------|--|--------------------------------|--|
| 51 | 6h 06min | 26min | Native Klappe nicht überstentet, Stent sitzt sehr Locker |
| 52 | 3h 30min | 45min | 2x3mm großes Loch in einer Tasche. Klappe lässt sich nicht freigeben, erneutes Laden mit problemloser Ablage der Klappe |
| 53 | 4h 45min | 38min | Stent 5mm tiefer als geplant implantiert, gute Funktion |
| 54 | 3h 35min | 25min | Ablagekatheter hat sich in Trikuspidalklappe verhakt. Beim Zurückziehen des Ablagesystems plötzlicher Ruck. Im ICE zurückschlagendes Segel und moderate Insuffizienz |
| 55 | 3h 2min | 18min | Klappe etwas zu weit distal, sitzt gut und native Klappe überstentet. Klappe schließt und öffnet gut. Spitze beim Zurückziehen verhakt. Der ultra-stiff-Draht wird von 9 auf 7cm verkürzt. |
| 56 | 3h 25min | 23min | Gute Implantationsposition, wieder Probleme beim Zurückziehen. Im ICE eingerissenes Segel |
| 57 | 3h 35min | 41min | Stent sitzt leicht schräg im Übergang vom RVOT zur PA. Wieder Probleme beim Zurückziehen. Kapsel immer prox. der Klappe. Häufige Bigimini. |
| 58 | 3h 16min | 38min | Kleines nicht strömungsrelevantes Loch, koaptiert nicht komplett im voll expandierten Stent. Verletzung der TK beim 1. Implantversuch. Draht nachgebogen, danach gute Ablage möglich. |
| 60 | 2h 32min | 65min | Gutes Einführen und Verschieben des Ablagesystems, bei der Ablage springt die Klappe 5mm distal in die mittlere PA. Doppelklappe. |
| 61 | 2h 10min | 31min | Problemlose Implantation, Zurückziehen und Anschlussuntersuchungen. |
| 62 | 3h | 65min | Bei Legen des Pigtail in PA reißt Standarddraht, ohne Probleme entfernt. Einfache Ablage und problemloses Zurückziehen. |
| 63 | 3h 30min | 81min | Probleme beim Abbiegen vom rechten Ventrikel in RVOT, Führungsdraht rutscht zurück. Erst im fünften Versuch erfolgreiche Implantation. |
| 64 | 2h 20min | 36min | Erster Implantationsversuch musste abgebrochen werden. Klappe nach dem Crimpen beschädigt und keine Ersatzklappe verfügbar. Zweiter Implantationsversuch problemlos. |
| 65 | 3h 48min | 106min | Kleines Tier (42kg), native Klappe stark verkalkt, aber gute Funktion. Implantation etwas zu weit distal, ansonsten gute Funktion. Extrasystole nach Stentablage. |
| 72 | - | 18min | Nach Ablage der Klappe, rapider Blutdruckabfall und Kammerflimmern. Reanimation erfolglos. |
| 73 | 3h 52min | 31min | Problemlose Implantation, 5mm zu weit distal im RVOT, native PK überstentet. Aufgrund von niedrigem Hb, 400ml Blutkonserven. |
| 75 | 4h 03min | 62min | Schwierigkeiten in RVOT abzubiegen, Draht nachgebogen, weiterhin nicht möglich. Klappe auf 8mm Kapsel gecrimpt, danach Ablage möglich. Beim Rückziehen erneut Probleme. |
| 100 | 3h 49min | 92min | Ablage erst im dritten Versuch möglich. Umcrimpen auf kürze Kapsel. Gute Stentposition, Spitze verhakt sich zweimal beim Zurückziehen am Stent. |

Tabelle 7: Übersicht der Implantationen der dezellularisierten tissue-engineerten Herzklappen.

Die Implantation der tissue-engineerten dezellularisierten Herzklappe in Pulmonalkappenposition verlief bei den 15 verbleibenden Tieren, bis auf die oben beschriebenen Ereignisse, ohne große Probleme. Die Tiere waren für die gesamte Dauer des Eingriffs hämodynamisch stabil und auch laborchemisch zeigten sich keine gravierenden Auffälligkeiten. Ein Tier erhielt aufgrund eines niedrigen Hbs und blassen Konjunktiven, die bereits vor der geplanten Implantation

3. Ergebnisse

auffielen, eine Bluttransfusion von 400 ml. Die Dauer von Anlage bis Entfernung der Schleusen dauerte im Durchschnitt 3 Stunden 33 Minuten, die kürzeste Implantation dauerte 2 Stunden und 10 Minuten (Tier 61) und die längste 6 Stunden 6 Minuten (Tier 51).

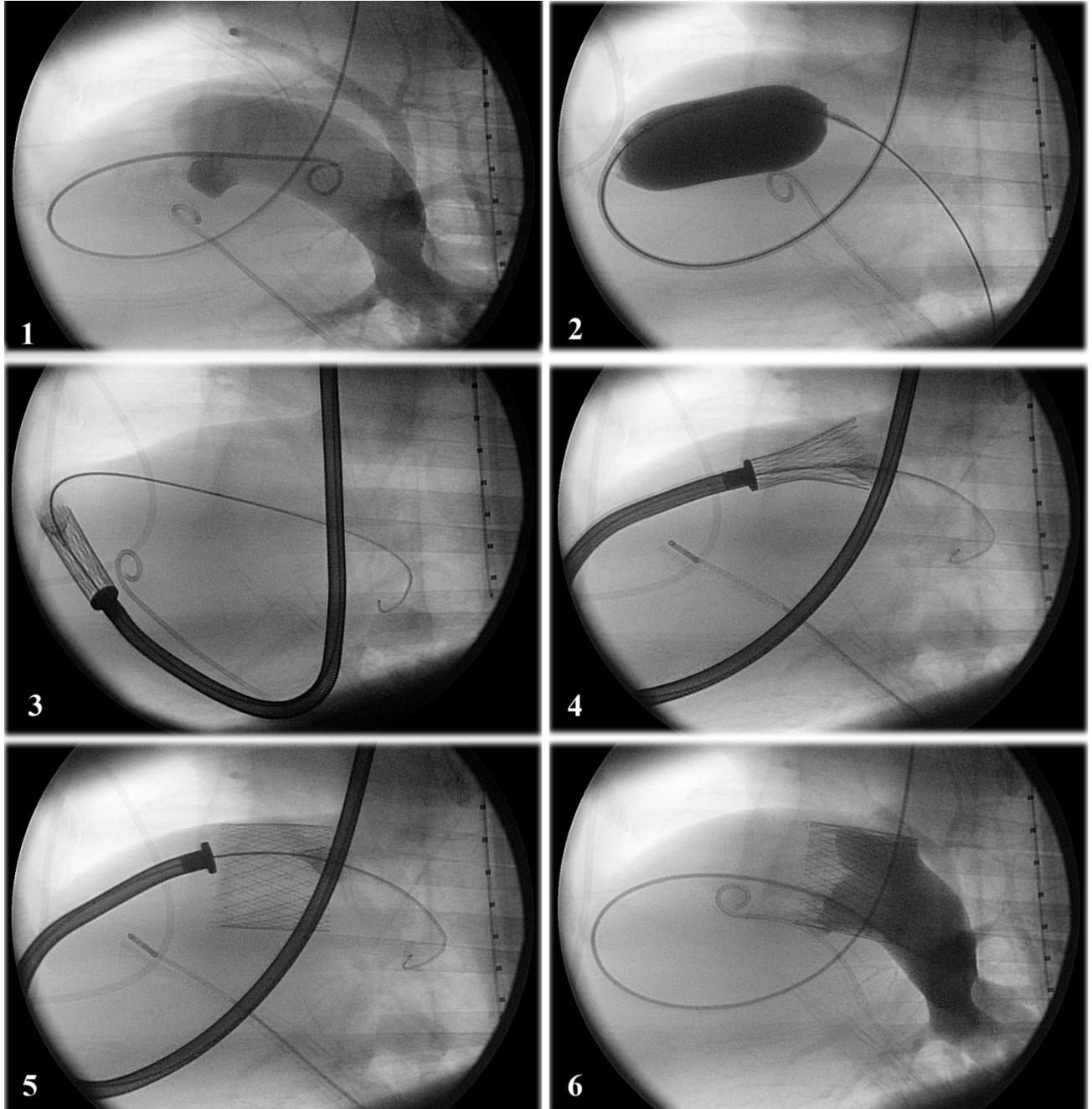


Abbildung 15: Exemplarischer Ablauf der Implantation der Tissue Engineerten Herzklappe.

Im ersten Bild (1) wird die native Klappe mittels Kontrastmittel dargestellt. Ein Pigtail-Katheter befindet sich im RVOT, der andere im rechten Ventrikel. (2) Ausmessen der nativen Klappe mit Hilfe eines Ballonkatheters. (3) Einbringen des Implantationskatheters über einen Führungsdraht. (4) Klappe befindet sich in der richtigen Position und wird frei gegeben. (5) Der Stent hat sich komplett entfaltet und der Implantationskatheter wird zurückgezogen. (6) Kontrolle der neuen Herzklappe mittels Kontrastmittel.

3. Ergebnisse

3.2.1 Crimping

Um die Schäden an der Klappe durch das Crimpen möglichst gering zu halten, wurde versucht die Zeit zwischen dem Crimpen und der Implantation möglichst kurz zu halten. Sie betrug im Durchschnitt $46,82 \pm 26,87$ min. Die Klappen aus der ersten Gruppe schienen sehr instabil und nicht sehr reißfest zu sein. Die bei den Tieren 52, 54 und 56 implantierten Klappen zeigten in der anschließenden intrakardialen Echokardiografie bereits eine Insuffizienz, nach der Explantation ließen sich makroskopisch abgerissene Taschen bzw. Löcher in den Taschen beobachten. Diese Beschädigungen sind wahrscheinlich im Rahmen des Crimpings entstanden, da die Klappen bei der Begutachtung vor dem Crimping noch keine Defekte aufwiesen. Wie bereits im Abschnitt 3.2 beschrieben, gab es bei den Klappen auch Probleme mit dem Zurückziehen der Spitze des Ablagesystems. Ob die Beschädigungen nun durch das Crimpen oder durch die Spitze entstanden, kann nicht unterscheiden werden.



Abbildung 16: Übersicht der beim Crimpen beschädigten Klappen.

1) Klappe des Tiers 56, großes Loch in der aortalen Tasche und leicht eingerissene Tasche rechts. 2) Tier 54, stark beschädigte rechte Tasche, aortale Tasche mit zwei Löchern und eingerissen. 3) Tier 52, abgerissenes aortale Tasche mit starker Verkürzung, rechtes ebenfalls kleines Loch zu erkennen.

3.2.2 Invasive Druckmessung

Proximal der Klappe, im rechten Ventrikel stiegen die gemessenen Drücke nach der Implantation der dTE-Klappe leicht an. In der Pulmonalarterie und direkt über der Klappe sanken die Drücke dagegen ab. (s. Diagramm 2). Insgesamt zeigten sich keine gravierenden Druckveränderungen, die für eine schlechte Klappenfunktion sprechen würden. Auch nach dem Eingriff, sobald die Tiere wieder in den Stall gebracht wurden, zeigten sich keine AZ-Verschlechterungen oder sonstige Auffälligkeiten.

3. Ergebnisse

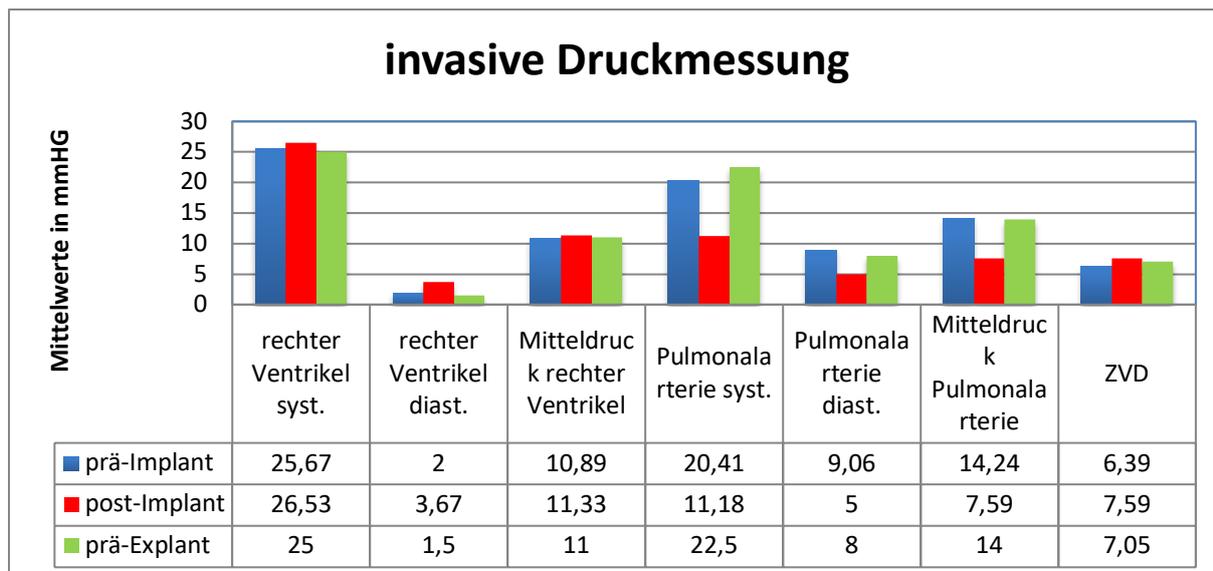


Diagramm 2: Invasive Druckmessung vor und nach Implantation der neuen Herzklappe in Pulmonalposition.

Gemessen wurde direkt an der Klappe sowie an den proximal und distal angrenzenden Strukturen.

Der mittlere systemische Blutdruck sank nach Implantation von 80,06 mmHg auf 75,24 mmHg. Die direkt an der nativen bzw. der neuen Herzklappe gemessenen Drücken sanken nach der Implantation der dTE-Klappe ab, allerdings ohne statistisch signifikanten Unterschied.

3.2.3 Kontroll-CT nach Implantation

Nach erfolgreicher Implantation der dezellularisierten tissue-engineerten Herzklappe erhielten die Tiere ein CT, um die Lage und Größe des Stents zu bestimmen. Vor der Implantation hatte der Stent, in den die Klappe eingenäht wurden, einen Durchmesser von 30 mm. Insgesamt wurden die Werte an drei Positionen, proximal, mittig und distal, bestimmt. Anhand der maximalen und minimalen Ausdehnung des Stents während eines Herzzyklus ließ sich so die Verformung des Stents beschreiben.

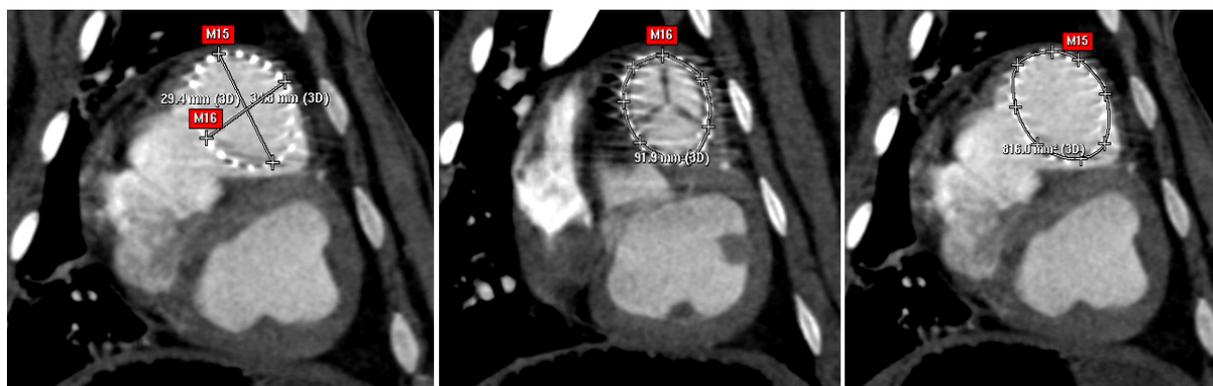


Abbildung 17 CT Messung des Tieres 100 nach Implantation der neuen Klappe.

3. Ergebnisse

Im linken Bild wurden die Durchmesser während der Diastole bestimmt. Im mittleren Bild der Umfang und im rechten Bild die Fläche.

| Messposition | Messung | Mittelwert syst. | Mittelwert diast. |
|-----------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| proximal | Max. Durchmesser | 31,21±1,9mm | 30,1±2,0mm |
| | Min. Durchmesser | 24,5±2,6mm | 26,1±2,5mm |
| | mittlerer Durchmesser | 27,9±1,4mm | 28,1±1,4mm |
| | Umfang | 88,8±4,4mm | 89,9±5,2mm |
| | Fläche | 605,7±60,1mm ² | 636,6±69,6mm ² |
| | Verformungsindex | 1,29±0,15 | 1,17±0,18 |
| mittig | Max. Durchmesser | 30,2±1,8 mm | 28,5±1,7 mm |
| | Min. Durchmesser | 24,9 ±2,5 mm | 26,4±1,6 mm |
| | mittlerer Durchmesser | 27,5±1,4 mm | 59,2±3,3 mm |
| | Umfang | 87,7±4,6 mm | 86,9±4,6 mm |
| | Fläche | 600,6±66,2 mm ² | 592,7±62,7 mm ² |
| | Verformungsindex | 1,22±0,12 | 1,23±0,57 |
| distal | Max. Durchmesser | 29,1±2,0 mm | 28,0±2,2 mm |
| | Min. Durchmesser | 25,3±2,3 mm | 25,0±1,5 mm |
| | mittlerer Durchmesser | 27,2±1,3 mm | 26,5±1,7 mm |
| | Umfang | 86,8±3,9 mm | 84,1±4,9 mm |
| | Fläche | 589,4±50,6 mm ² | 558,0±62,3 mm ² |
| | Verformungsindex | 1,16±0,13 | 1,12±0,07 |

Tabelle 8: CT Messwerte nach der Implantation der tissue-engineerten dezellularisierten Herzklappe.

3.3. Funktion der Klappen im Follow-Up

Um die Funktion der dezellularisierten tissue-engineerten Herzklappen in Pulmonalposition zu beurteilen, wurden verschiedene Parameter mittels intrakardialer Echokardiographie und Magnetresonanztomographie bestimmt.

3.3.1 Intrakardiale Echokardiographie (ICE)

Die Klappen der Tiere 52, 54 und 56, die beim Crimping beschädigt wurden, zeigten bereits eine moderate Insuffizienz, bei den unbeschädigten Klappen wurden lediglich milde bzw. keine Insuffizienzen beobachtet (s. Diagramm 4). Da nicht alle Tiere im kompletten Follow-up über 52 Wochen beobachtet werden konnten, sind diese Tiere in Diagramm 5 in grau dargestellt. Außerdem konnte nicht jedes Tier zu jedem Follow-up Termin untersucht werden. Falls die Untersuchung nicht stattfinden konnte, wurde es beim nächsten Termin vier Wochen später wieder untersucht.

3. Ergebnisse

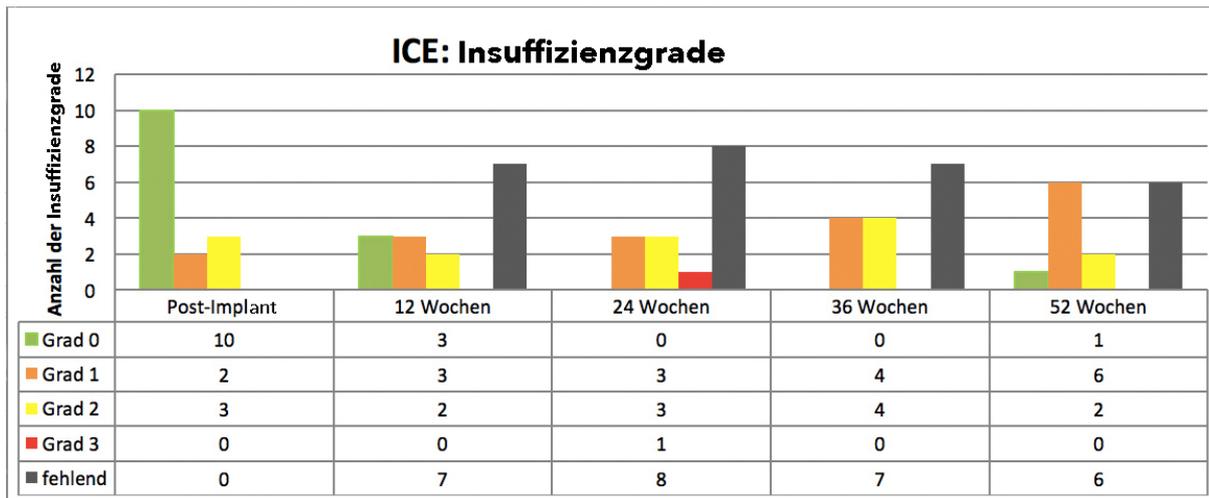


Diagramm 3: Übersicht der Insuffizienzgrade der Klappen im Follow-Up.

Grad 0 (grün) = keine Insuffizienz, Grad 1 (gelb) = milde Insuffizienz, Grad 2 (orange) = moderate Insuffizienz, Grad 3 (rot) = schwere Insuffizienz. Alle fehlenden Daten wurden mit grau dargestellt.

In der Abbildung 18 ist exemplarisch eine intrakardiale Echokardiographie dargestellt. Es ist zu sehen, wie sich die Klappe während der Diastole schließt und sich ein moderater Insuffizienzjet bildet, der zurück in den rechten Ventrikel strömt.

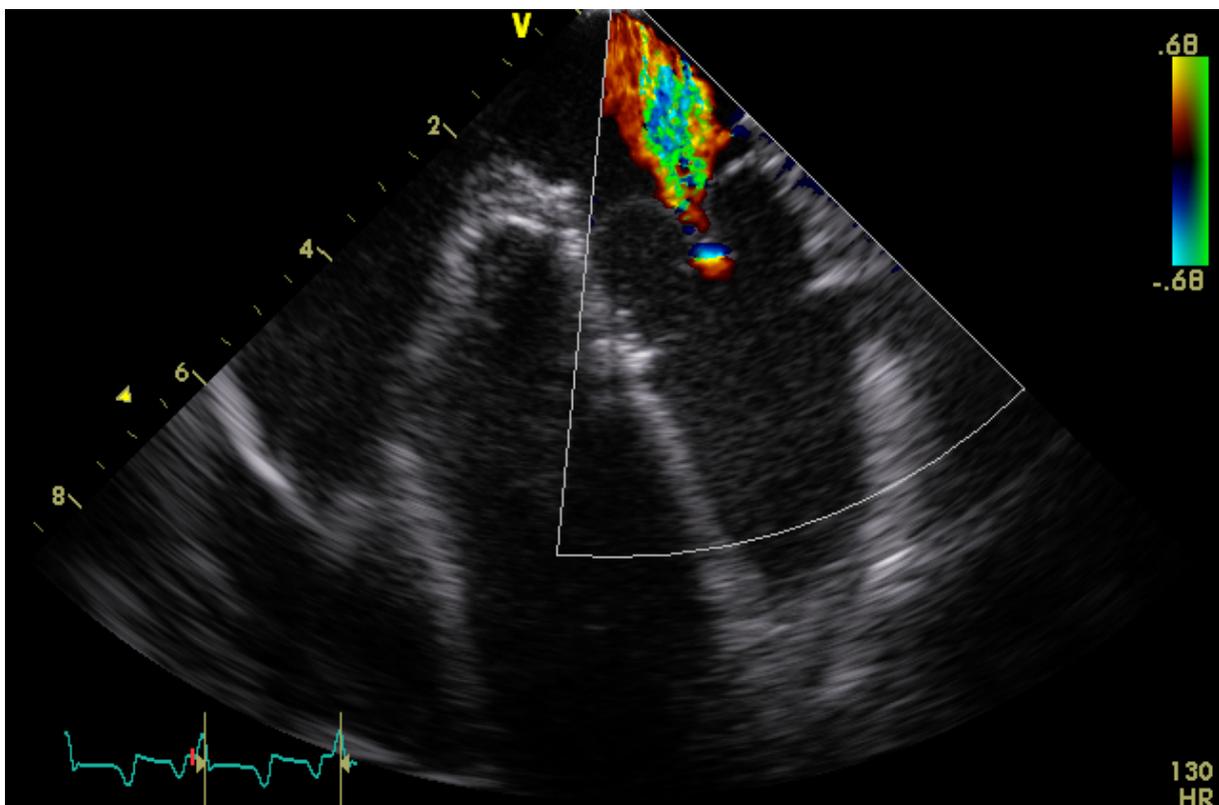


Abbildung 18 Intrakardiale Echokardiographie
Intrakardiale Echokardiographie des Tieres 73 in der 48. Woche. Zu sehen ist ein moderater zentraler Insuffizienzjet der Tissue Engineerten Pulmonalklappe im Color Flow Mode.

3. Ergebnisse

In der nachfolgenden Abbildung 19 sind die anderen Untersuchungspunkte der intrakardialen Echokardiographie dargestellt. Exemplarisch wurden hier die Bilder des Tieres 65 in der 48. Woche gewählt. Bild 1 zeigt die geschlossene dTEHV während der Diastole. In Bild 2 wird im M-Mode die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) bestimmt. Die gemessenen Werte sind in Diagramm 5 dargestellt. Es zeigten sich keine pathologisch erhöhten Werte in der Untersuchung $<2,5$ m/s [108]. Der Median liegt über die ganze Zeit des Follow-ups unter 1,5 m/s. Dies spricht für eine sehr gute Klappengeometrie und ein gutes Öffnen der Klappe ohne Anzeichen von Stenose. Die gemessenen maximalen Druckgradienten waren auch nicht pathologisch erhöht. Bei der proximal isovelocity surface area (PISA) handelt es sich um eine halbkreisförmige Struktur, die sich an der dem Ventrikel abgewandten Seite der Klappe bildet. Der Radius der PISA beträgt in Bild 3 3 mm. In Bild 4 wurde die Vena contracta ausgemessen, sie beträgt 2mm und misst die schmalste Stelle, an der sich der Insuffizienzjet im CW-Doppler zeigt.

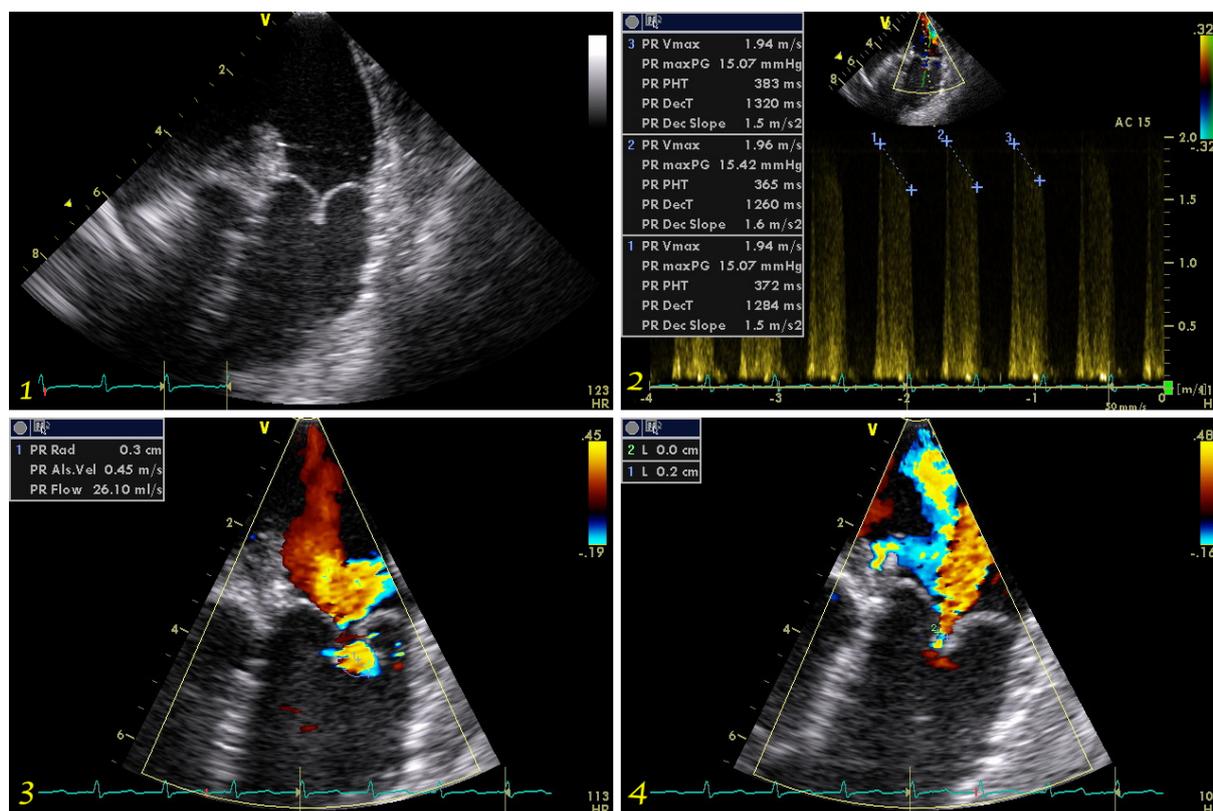


Abbildung 19: Intrakardiale Echokardiographie nach 48 Wochen bei Tier 65.

In Bild 1 ist die Pulmonalklappe während der Diastole zu sehen. Die Klappe zeigt eine sehr gute Adaptation und schließt komplett. In Bild 2 wurde die V_{max} im continuous flow doppler (CFD) bestimmt. Hierbei handelt es sich um die maximale Geschwindigkeit, die direkt über der Klappe während des diastolischen Rückstroms gemessen wird. In Bild 3 wurde die PISA im Color-Flow Doppler Modus bestimmt, sie betrug in diesem Fall 3mm. Bild 4 zeigt das Vermessen der Vena contracta, in diesem Bild 2 mm. Die Vena contracta wurde ebenfalls im Color-Flow Doppler Modus bestimmt.

3. Ergebnisse

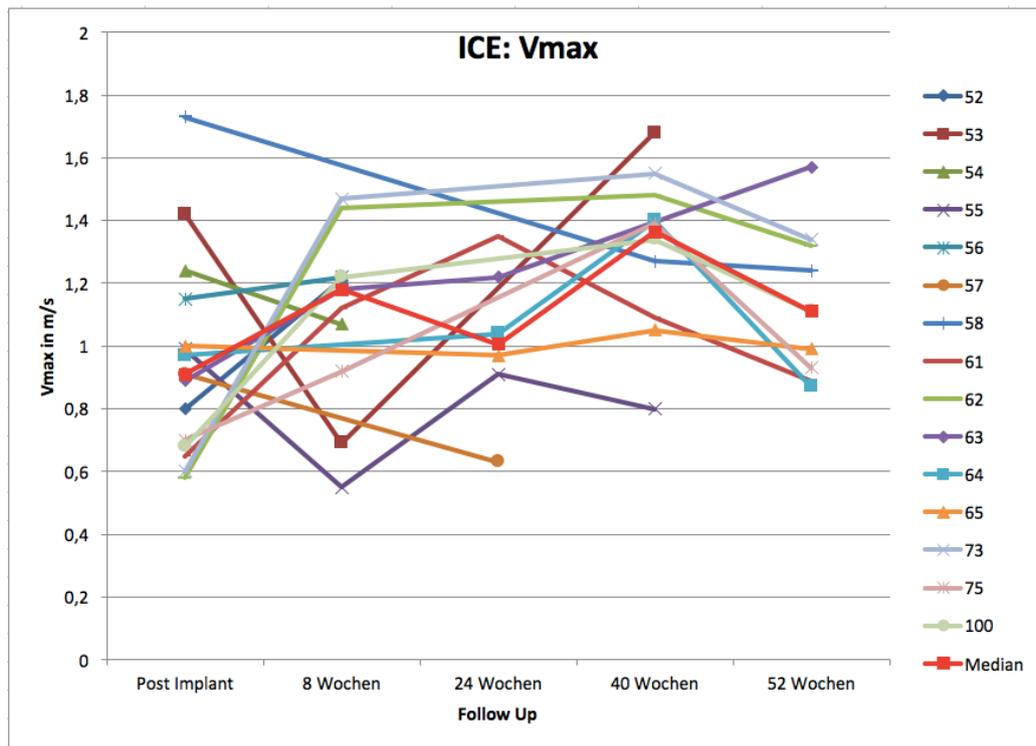


Diagramm 4: Übersicht Flussbeschleunigung

Übersicht der maximal gemessenen Geschwindigkeit (V_{max}) gemessen in m/s im Follow-Up über 52 Wochen. In rot ist der Median dargestellt, er bewegt sich über die gesamte Dauer des Follow-ups unterhalb der Grenze von 1,5 m/s.

3.3.2 Magnetresonanztomographie (MRT)

In der Magnetresonanztomographie Flussmessung wurde der quantitative Vorwärtsfluss, aus dem rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie über der Pulmonalklappe gemessen. Die Regurgitationsfraktion (RF) über die gesamte Dauer des Versuches lag die Regurgitationsfraktion (RF) des Medians unter 15% (s. Diagramm 6). Die gemessene RF überstieg bei Tier 57 in der Follow-up Untersuchung nach 24 Wochen die 30%-Grenze und bei Tier 55 nach 40 Wochen. Beide Tiere wurden im Anschluss eingeschläfert.

3. Ergebnisse

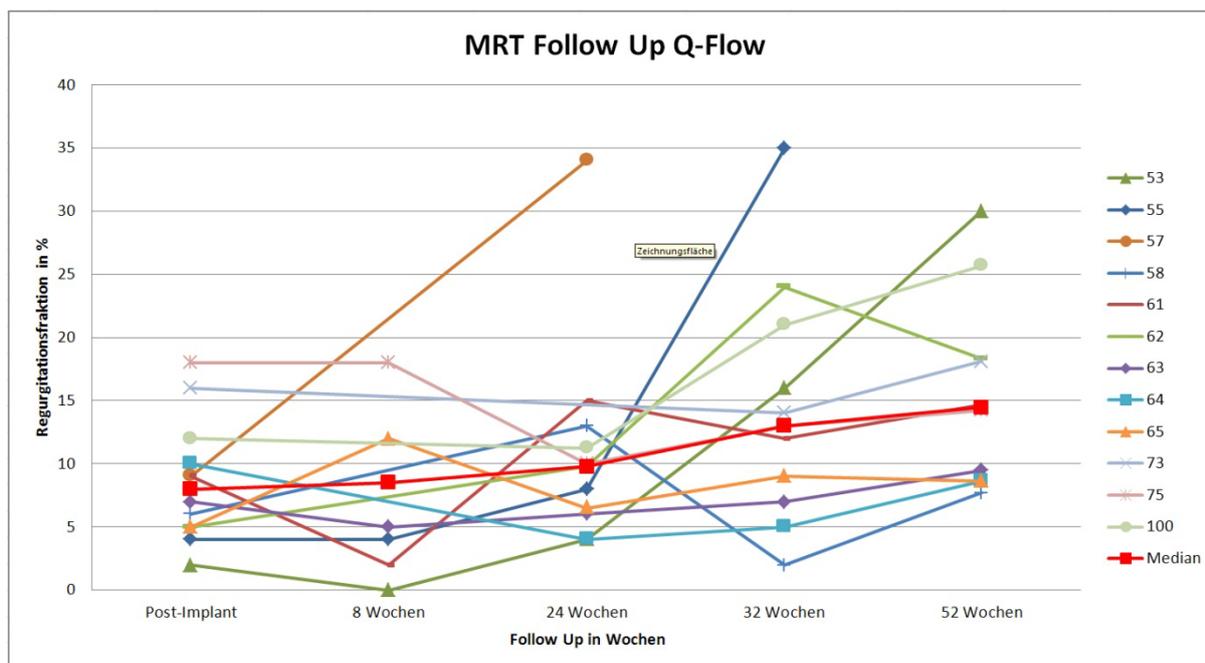


Diagramm 5: Quantitativer Fluss (Q-Flow) im Follow-Up über 52 Wochen.

In rot ist der Median dargestellt. Die Daten der Tiere 52, 54 und 56, deren Klappen beim Crimping beschädigt wurden, wurden hier nicht dargestellt, sind aber in den Median mit eingerechnet.

3.4 Makroskopie

Nachdem das Herz explantiert wurde, wurde zunächst das Perikard entfernt und geschaut, ob sich Flüssigkeit im Perikardbeutel angesammelt hatte. Anschließend wurde das Herz gewogen, fotografiert und die Position des Stents beurteilt und vermessen (s. Abb. 20). Nach Explantation des Herzens fiel auf, dass bei insgesamt sechs Präparaten (s. Tabelle 9) der Stent am distalen Ende die Pulmonalarterie perforiert hatte (s. Abb. 21). In vivo und direkt bei Eröffnung des Thorax war die Perforation noch nicht zu sehen. In nur einem Fall (Tier 53) wurde neben dem distalen Ende auch das proximale Stück durch eine Strebe des Stents durchspießt. Das gemittelte Herzgewicht betrug bei Explantation $238,3\text{g} \pm 50,9\text{g}$.

Im Anschluss wurde der rechte Ventrikel eröffnet, begutachtet und die Beobachtungen dokumentiert. Hier zeigten sich keine Verletzungen oder entzündlichen Reaktionen auf den Stent. Danach wurde die Pulmonalklappe mit Stent und Truncus pulmonalis herausgeschnitten. Alle Präparate zeigten ein gutes Einwachsen in das umliegende Gewebe, es gab keinen Anhalt dafür, dass die Stents nicht richtig verankert waren. In der Hinge-Region wurden keine Thromben gefunden.

Die einzelnen Taschen der Klappen wurden auf ihre Dichtigkeit (s. Abb. 20, Bildreihe c) überprüft und es wurde auf Verwachsungen begutachtet. Insgesamt wurden bei acht Klappen (s.

3. Ergebnisse

Tab. 9) ein oder mehrere Löcher beobachtet, die meisten dieser Löcher oder Rupturen wurden wahrscheinlich durch das Crimping verursacht und oft bereits in der Echokardiografie entdeckt.

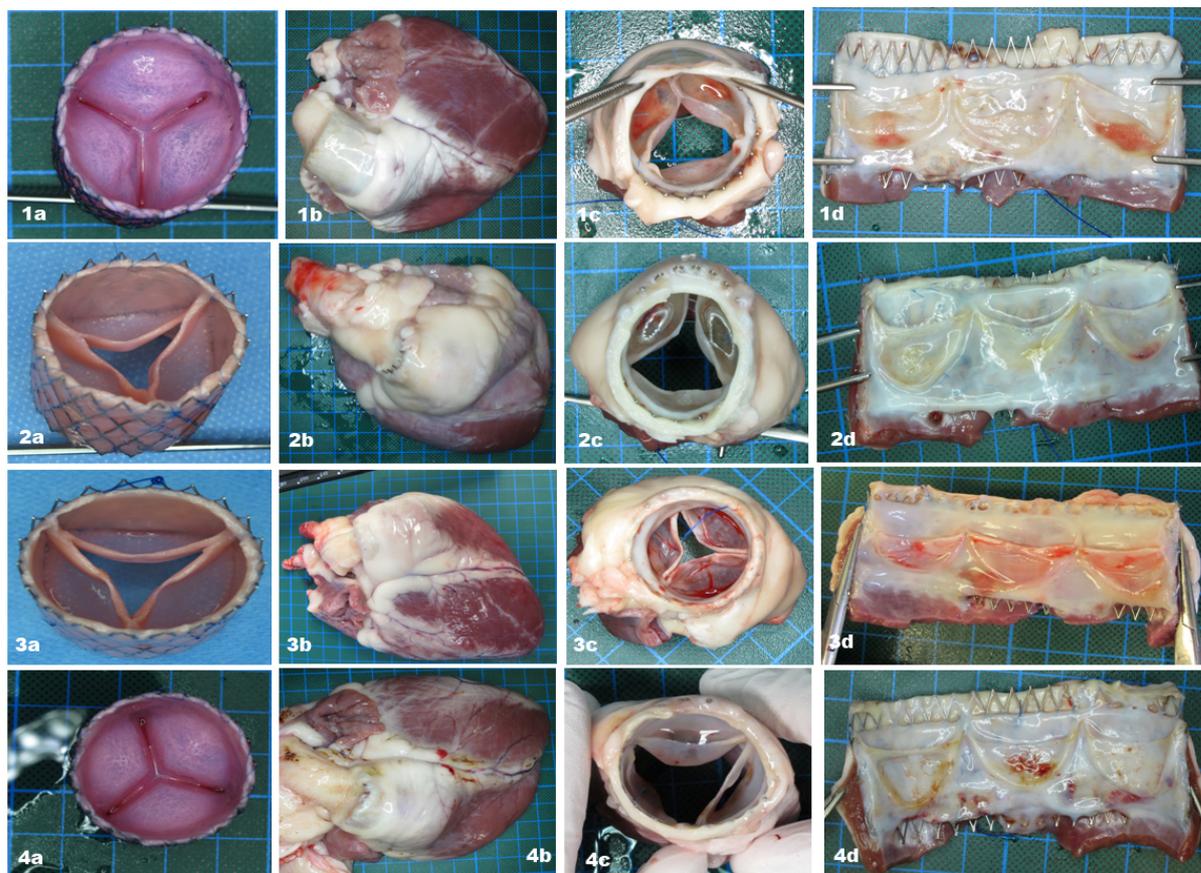


Abbildung 20: Übersichtsbilder

Bild 1a-1d Tier 56, Explantation nach acht Wochen Bild 2a-2d Tier 57, Explantation nach 24 Wochen, Bild 3a-3d, Tier 55, Explantation nach 40 Wochen Bild 4a-4d Tier 63, Explantation nach 52 Wochen. Die Bilder mit dem Buchstaben a) zeigen die dTEHV vor der Implantation, b) das explantierte Herz mit Aufsicht auf den Stent, c) zeigt die Pulmonalklappe nach der Explantation und d) die zerschnittene Klappe mit Aufsicht auf die einzelnen Segel.

| Tier | Tasche beschädigt | | | Thrombus | Entzündungszeichen | Stentperforation | Kalk | Auflagerung | | |
|------|-------------------|--------|--------|----------|--------------------|------------------|------|-------------|--------|--------|
| | links | aortal | rechts | | | | | links | aortal | rechts |
| 51 | ✓ | ✓ | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 52 | x | ✓ | ✓ | x | x | ✓ | x | ✓ | ✓ | ✓ |
| 53 | ✓ | x | x | x | x | ✓ | x | x | x | x |
| 54 | ✓ | ✓ | ✓ | x | x | x | x | ✓ | ✓ | x |
| 55 | ✓ | ✓ | ✓ | x | x | ✓ | x | x | ✓ | x |
| 56 | x | ✓ | x | x | x | x | x | ✓ | x | ✓ |
| 57 | x | x | x | x | x | ✓ | x | x | x | ✓ |
| 58 | x | ✓ | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 60 | x | x | x | x | ✓ | ✓ | x | ✓ | x | x |
| 61 | ✓ | x | x | x | x | ✓ | x | x | x | ✓ |
| 62 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 63 | x | x | x | x | x | x | x | ✓ | ✓ | ✓ |
| 64 | x | x | x | x | x | x | x | ✓ | x | x |
| 65 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 73 | x | x | x | x | ✓ | x | x | ✓ | ✓ | x |
| 75 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 100 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |

Tabelle 9: Übersicht der makroskopischen Beurteilung der explantierten Pulmonalklappen.

3. Ergebnisse

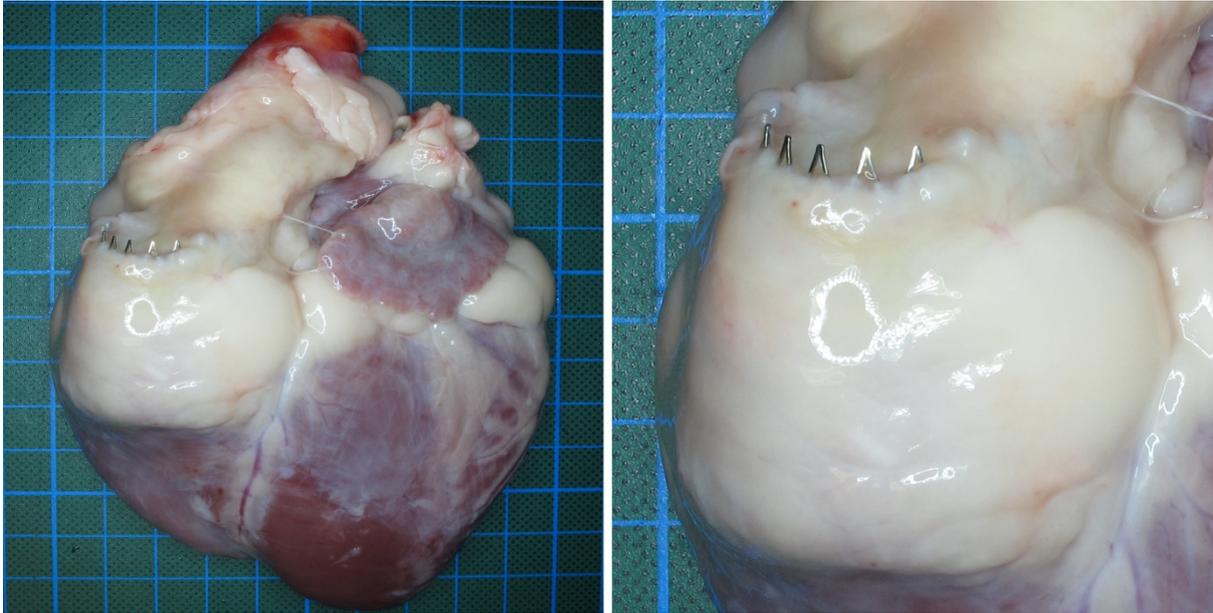


Abbildung 21: Stentperforation

Explantiertes Herz des Tieres 57 es ist deutlich zu sehen, wie der Stent die Gefäßwand perforiert hat. Die Perforation zeigte sich erst post mortem.

Ein weiteres häufiges Problem von Herzklappen ist die Verkalkungen, doch auch dieser Prozess war in keiner der Klappen makroskopisch sichtbar.

In Abb. 22 Bild 2 zeigten sich eine Verwachsung in mittlerer Höhe der aortalen Taschen mit der Gefäßwand, dies wurde nur bei Tier 61 beobachtet.

Die neu besiedelte Oberfläche zeigte sich in den meisten Fällen als dünne weißliche Schicht (Abb. 22 Bild 1). Neun Klappen zeigten verschieden farbige Verfärbungen in unterschiedlicher Ausprägung, hierbei handelt es sich höchst wahrscheinlich um Mikrotraumen, die durch den Katheter entstanden sind. Dabei wurde die Gefäßwand leicht beschädigt und es entstand ein kleines Hämatom (s. Abb.22).

In insgesamt sechs Tieren zeigte sich, wie in Abb. 21 zu sehen ist, eine Perforation der Pulmonalarterie durch die Spitze des Stents post mortem. Da das Herz bei der Explantation blutleer war, scheint durch die kollabierte Pulmonalarterie dieser Effekt verstärkt zu sein. In vivo bei der Eröffnung des Thorax und in den CT-Untersuchungen konnte keine Perforationen beobachtet werden.

3. Ergebnisse

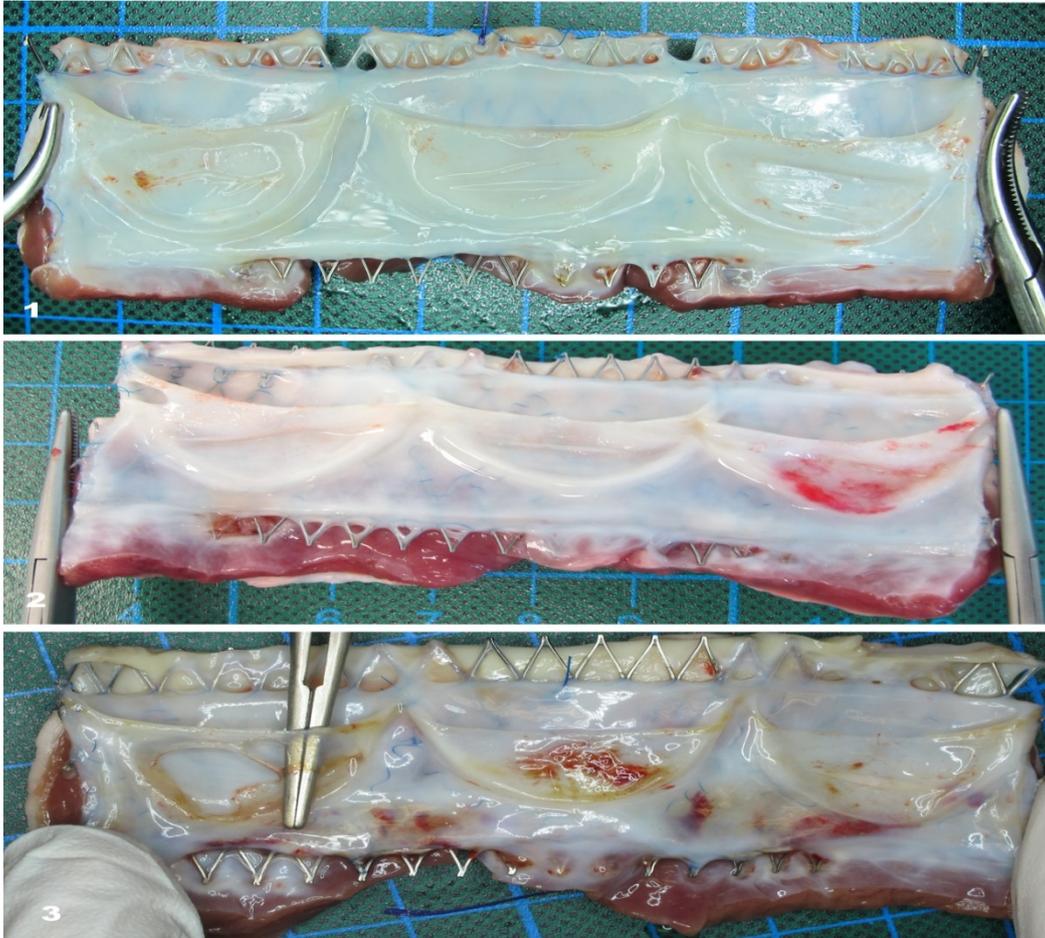


Abbildung 22: Übersicht der Klappenauffälligkeiten

1) Explantierte Klappe Tier 65, keine Löcher minimale Auflagerung auf der linken Tasche. 2) Tier 61, kleines Loch in der linken Tasche, rechte Tasche rötlich verfärbt. 3) Tier 55, großes Loch in der linken Tasche, kleines Loch in der aortalen und rechten Tasche, (aus dieser Perspektive kaum erkennbar).

Tier 73 zeigte eine starke, erhabene Rötung im Bereich der Taschen (s. Abb. 23). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine Entzündungsreaktion. Für eine genauere Differenzierung wurden histologische Schnitte der markanten Stelle angefertigt, für die ausführlichen Befunde s. Abschnitt 3.5.2.

3. Ergebnisse



Abbildung 23: makroskopische Endokarditis

Aufgeschnittene Klappe des Tieres 73, in der aortalen Tasche sind deutliche rötliche, körnige Auflagerungen zu erkennen. Typisches Bild einer Endokarditis.

3.5 Histologie der Klappen

Insgesamt wurden 17 dTE Herzklappenprothesen nach interventioneller minimalinvasiver Methode in Pulmonalklappenposition im Schaf implantiert. Ausgewertet wurde die in Formalin fixierte linke Hälfte der aortalen Tasche. Die Präparate wurden in Methylnmethacrylat eingebettet, anschließend wurden die oben beschriebenen Färbungen vorgenommen (Tab. 5) ein Dünnschliffpräparat angefertigt, die Präparate wurden dann mikroskopisch untersucht und ausgewertet.

3.5.1 Einwachsen und Position des klappentragenden Stents

In allen untersuchten Präparaten zeigte sich in den beurteilten Abschnitten eine gleichmäßige Entfaltung der Stents. Die Ablage der dTEHV erfolgte meist mittig auf Höhe der nativen Pulmonalklappe. Bei den Tieren 65, 73 und 75 wurde die Klappe etwas zu weit distal platziert. Die native Klappe wurde zwar überstentet, allerdings zeigte sich in diesen drei Fällen, dass die Apposition der Stentgrafts an den RVOT nicht vollständig war. In Abbildung 24 ist die inkomplette Apposition zu sehen. Bei vier weiteren Tieren konnte ebenfalls beobachtet werden, dass der Scaffold nicht komplett mit der Pulmonalarterie verwachsen war (Tier 53, 54, 56 und 63). In 56,25 % (9/16) der Präparate zeigte sich ein lückenloses Verwachsen der Tissue Engineerten Klappe mit der nativen Pulmonalwand.

3. Ergebnisse

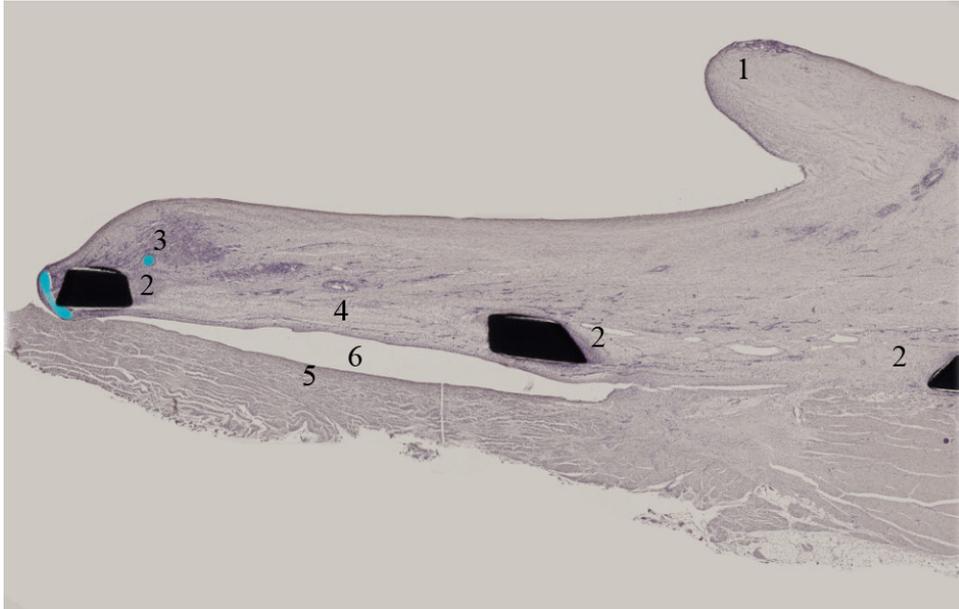


Abbildung 24 Tier 65, Haemalaun Färbung.

Schnitt sehr weit außen an der Tasche, deshalb nur noch der Rand zu sehen (1). Die schwarzen Viereck zeigen den Stent (2), hellblau/türkise ist das Nahtmaterial, mit dem die dTEHV im Stent befestigt wurde (3). (4) markiert die der Gefäßwand abgewandte Seite der Herzklappe, (5) native Seiten des RVOT, (6) zeigt die unvollständige Apposition der dTEHV und den RVOT. Ggf. handelt es sich auch um ein Artefakt, dies lässt sich aber nicht differenzieren.

Bei allen Präparaten zeigte sich sowohl makroskopisch als auch histologisch ein überwiegendes Verwachsen des Grafts mit der Pulmonalwand. In keinem einzigen Fall wurde ein Thrombus im Bereich zwischen der Gefäßwand und der neuen Herzklappe entdeckt.

Um die Streben des Stents zeigte sich in allen Präparaten α -SMA positives vaskuläres Bindegewebe (α -SMA positive Myofibroblasten mit umgebender kollagenreicher Extrazellulärmatrix), s. Abb. 25). Dieses Gewebe konnte auch regelhaft subendothelial im Bereich der lumenseitigen Oberfläche gefunden werden. Im Übergangsbereich und an der Kontaktfläche zwischen der nativen Gefäßwand und dem Graft konnte außerdem in einer Vielzahl der Präparate eine Neovaskularisierung beobachtet werden, (s. Abb. 25 (3)). Auch sonstige Metaplasien oder Raumforderungen fanden sich nicht.

3. Ergebnisse

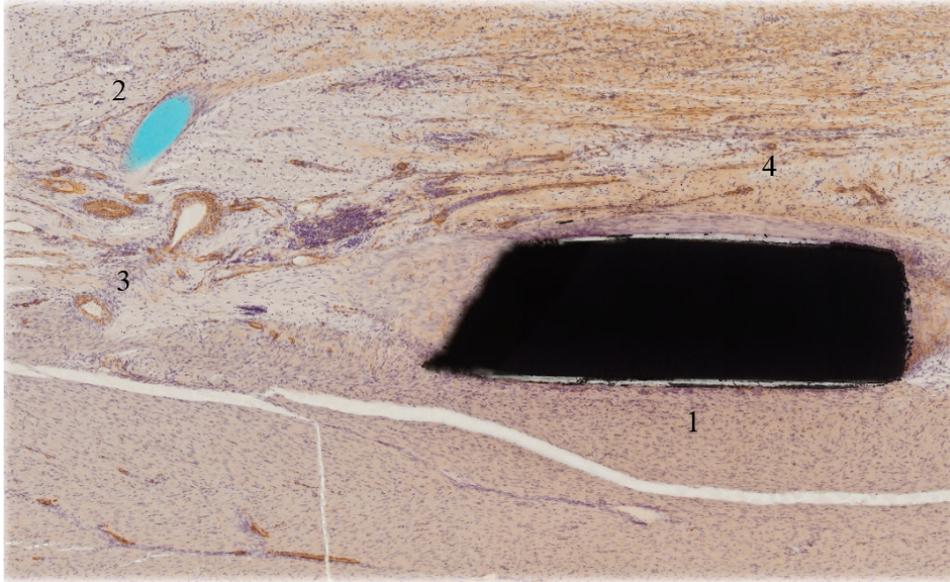


Abbildung 25 Tier 62, α -SMA Färbung.

(1) Stentstrebe, (2) Nahtmaterial, (3) Gefäße innerhalb des Grafts, (4) α -SMA positives Gewebe.

In keinem der 17 Präparate konnten eine Nekrose oder avitales Gewebe innerhalb des Grafts und der umliegenden nativen Pulmonalarterie und des RVOTs beobachtet werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Radialkraft der Stents nicht zu groß war und es zu keinem schädigenden Druck auf das umliegende Gewebe kam. Dennoch zeigten sich in manchen Präparaten post mortem perforierte Gefäßwände durch die Spitzen des Stents. Die Radialkraft war auch nicht zu gering, denn die Klappen konnten in den meisten Fällen sehr gut einwachsen und zeigten in den Follow-up Untersuchungen kein Verrutschen des Stents.

3.5.2 Taschen der dTEHV

Die Taschen der tissue-engineerten Klappen zeigten histologisch in den meisten Fällen eine glatte und zarte neu gebildete Oberfläche. In den Schnitten der Tiere 51, 52 und 54 konnten thrombotische Auflagerungen beobachtet werden. Bei Tier 73 fand sich eine oberflächliche Auflagerung, mit histologisch nachgewiesenen eingelagerten Granulozyten und Lymphozyten. Dieses Bild spricht sehr für eine frische lokale begrenzte Endokarditis oder eine septische Absiedlung. Die Klappenränder zeigten keine thrombotischen Auflagerungen, allerdings wurden bei den Tieren 51, 52 und 54 thrombotische Auflagerungen in der Hinge-Region gesehen. In Abb. 26 Bild 2b ist dies als bläulich-lila Verfärbung im Bereich des Recessus zu sehen. Die in Tabelle 11 angegebenen Messwerte für die Klappenstärke sind nur eingeschränkt auf die ganze Taschenklappe oder die jeweils benachbarten Klappenanteile übertragbar, da selbst innerhalb

3. Ergebnisse

einer untersuchten Klappe erhebliche Differenzen der Stärke in verschiedenen Präparaten gemessen wurden. In Abb. 29 ist zu sehen, wie unterschiedlich die Stärke der Klappe, selbst innerhalb eines Schnittes sein kann. Des Weiteren wurde beobachtet, dass sich eigentlich in allen Präparaten eine Verdickung der Klappenränder zeigte. Eine Neovaskularisation innerhalb der Tasche der dTEHV fand sich aber in keinem Fall. In vielen Präparaten zeigten sich Reste des Scaffolds in der Spitze der Klappe (s. Abb. 27 Bild 4a und 4c, Abb. 29 Bild 3), in manchen Präparaten zeigte sich um diese Reste des Scaffolds am Taschenklappenrand eine Ansammlung von Makrophagen.

| Gruppe | I | II | III | IV |
|---|-----------|-----------|------------|-----------|
| Scaffoldreste in der Taschenspitze | 80% (4/5) | 50% (2/4) | 100% (2/2) | 25% (1/4) |

Tabelle 10: Scaffoldreste in der Spitze der Taschenklappe, unterteilt nach den Gruppen aus Tabelle 3.

In den früh explantierten Schnitten, der Tiere 51, 52, 54 und 56 zeigten sich Fibrinauflagerungen von unterschiedlicher Ausprägung, sehr deutlich ist dies in Abb. 29, Bild 1 als rötliche Verfärbung zu sehen. In keinem der zu einem späteren Zeitpunkt explantierten Klappen konnte diese Auflagerung beobachtet werden. Sie gehört möglicherweise zum Umbau der Klappen in einem frühen Stadium und wird im Laufe der Zeit wieder abgebaut.

3.5.3 Endothelialisierung und Neointima

Mit der immunhistochemischen Anti-von-Willebrand-Färbung ließ sich die Endothelialisierung der dTEHV und der tissue-engineerten Gefäßwand darstellen (Abb. 26). Bereits nach acht Wochen konnten teilweise einzelne Endothelschichten nachgewiesen werden, diese zeigten sich nur schwach positiv in der Färbung. An der Oberfläche zeigte sich aber ein durchgehendes Endothel, das an der ventrikulären Seite der Klappe etwas weniger stark ausgeprägt war. An der Graftwand war die Endothelialisierung in allen Fällen durchgehend vorhanden und gut erkennbar. An den Klappen, die zu einem späteren Zeitpunkt explantiert wurden, konnte eine regelhaft Endothelialisierung im Bereich von Graftwand und Klappen nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse

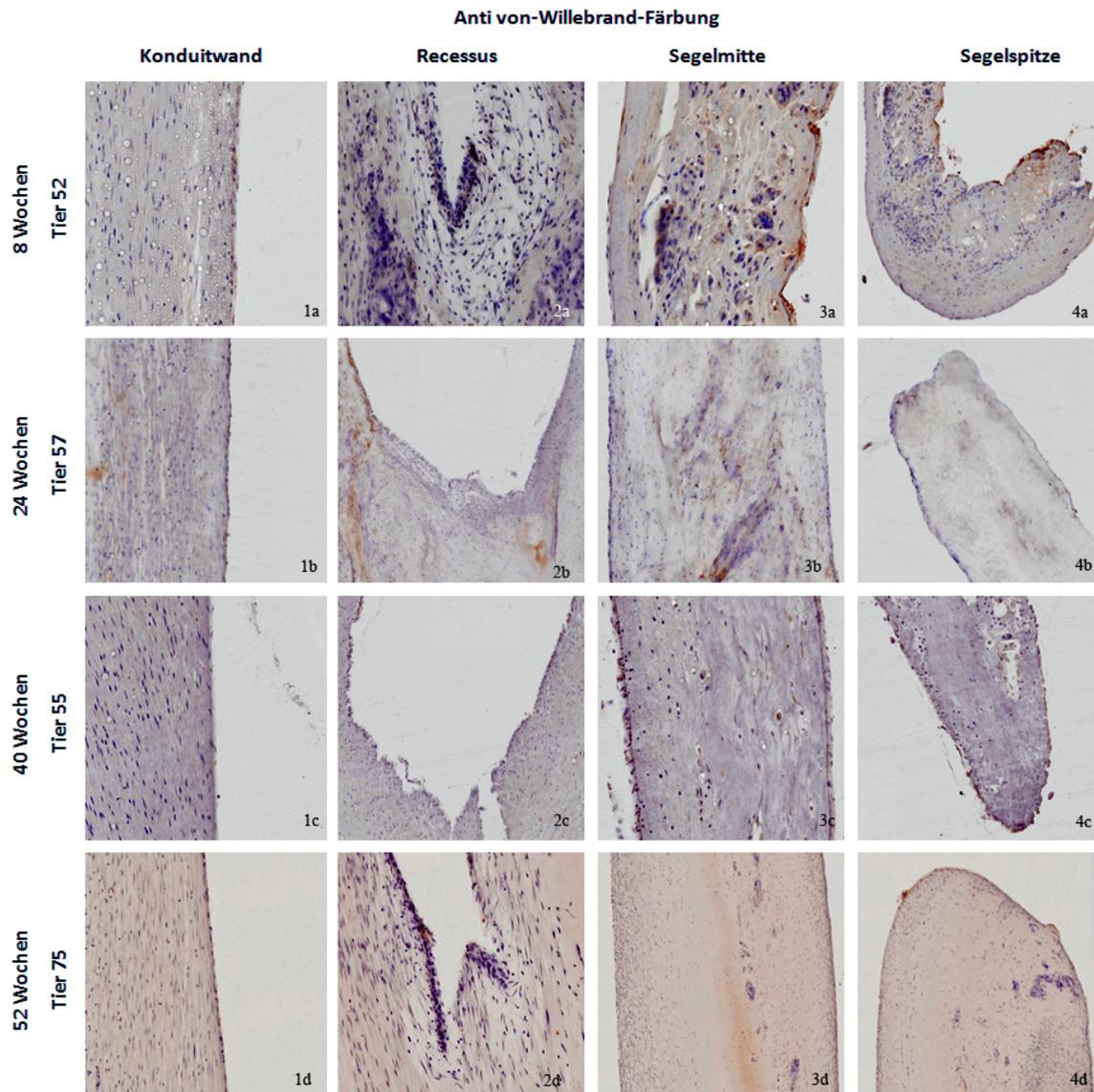


Abbildung 26: Endothelialisierungsprozess

In diesem Bild sind vier unterschiedliche Klappen in vier verschiedenen Abschnitten abgebildet. Sie wurden mit Antikörpern gegen den von-Willebrand-Faktor gefärbt. Mit dieser Färbung lässt sich eine Aussage über das Ausmaß der Endothelialisierung treffen. Bereits in der achten Woche sieht man, dass der Endothelialisierungsprozess deutlich vorhanden ist, ab der 24. Woche ist eine vollständige Endothelialisierung zu beobachten.

Die zwischen Endothel und Scaffold gebildete oberflächennahe Neointima-Schicht weist reichlich spindelförmige, SMA-positive Zellen mit wenig umgebender Extrazellulärmatrix im Sinne von Myofibroblasten mit einer Stärke von bis zu 50 μm auf. Die Zellen des neugebildeten Gewebes unmittelbar um das Scaffold sind ebenfalls überwiegend SMA-positiv. Eine Neointima wurden außer bei Tier 51 überall beobachtet. Eine überschießende Proliferation der Neointima gab es in keinem der Schnitte. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Stärke dieser neu gebildeten Schicht, die Werte lagen zwischen 100 und 500 μm und betragen im Mittel $256,25 \pm 142,49 \mu\text{m}$. Innerhalb der Klappe wurde in keinem Präparat eine abgrenzbare Neointima gebildet.

3. Ergebnisse

3.5.4 Wiederbesiedlung

Insgesamt zeigten sich sowohl in der Klappe als auch im Graft eine gutes Einwanderungsverhalten von neuen Zellen in die vor Implantation dezellularisierte Tissue Engineerte Pulmonalklappe. Die Projektpartner in Zürich haben eine DNA-Quantifizierung durchgeführt. Hier zeigte sich, dass zwar Zellen und DNA vorhanden waren, allerdings deutlich weniger als in einer nativen Klappe. Die in der dTEHV gefunden Zellen und DNA-Anteile entsprachen nur 20-25% im Vergleich zur nativen Klappe. In der Klappe des Tieres 51, die schon nach zwei Wochen explantiert wurde zeigten sich noch keine α -SMA positiven Zellen, doch nach acht Wochen waren diese Zellen bereits ausgeprägt vorhanden (s. Abb. 27). Nach 52 Wochen konnte auch eine starke Rezellularisierung der Klappe beobachtet werden.

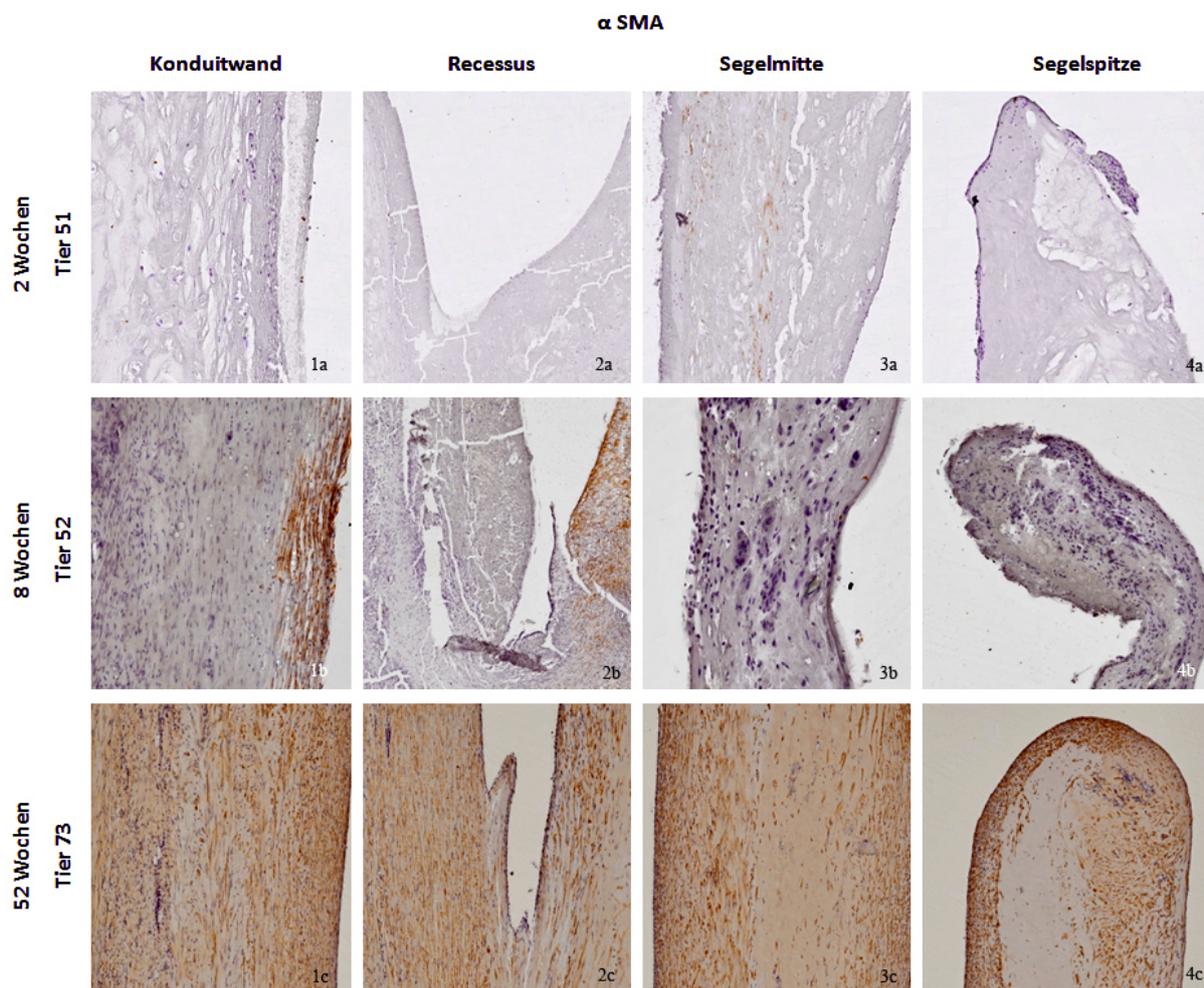


Abbildung 27: Wiederbesiedlung

Mittels der α -SMA-Färbung (smooth muscle actin) lässt sich die Wiederbesiedlung der dezellularisierten tissue-engineerten Herzklappe beurteilen. Sie färbt Myofibroblasten braun an. Nach zwei Wochen ist die Rezellularisierung noch nicht zu beobachten, nach acht Wochen sieht man in der Wand schon eine deutliche Anfärbung, im Segel hingegen noch nicht. In der 52. Woche ist die komplette Klappe von der Konduitwand über den Recessus bis zur Segelspitze komplett mit Zellen besiedelt.

3. Ergebnisse

In allen untersuchten Präparaten waren Entzündungsreaktionen nachweisbar. Es fanden sich lose verteilte Lymphozyten oder auch lymphozytäre Infiltrationen im neu gebildeten Gewebe ohne unmittelbaren Kontakt zum Scaffold oder zu den Metallstreben der Stents, die am ehesten als Ausdruck des Gewebeumbaus zu werten sind. In der Regel waren die lymphozytären Infiltrationen jeweils gemischt B- und T-lymphzellulär. In keinem Fall wurde eine massive Invasion von Lymphozyten innerhalb eines Präparates gesehen (s. Tabelle 11).

In allen Fällen zeigte sich eine ausgeprägte Fremdkörperreaktion im Bereich des Scaffolds der Graftwand mit Ansammlung von Makrophagen (Histiozyten) und Ausbildung von Fremdkörper-Riesenzellen. In einigen Fällen fand sich eine Fremdkörperreaktion auch an den Metalloberflächen der Stentstreben. Prinzipiell kann man zwei Phänotypen von Makrophagen unterscheiden, die unterschiedliche Aufgaben besitzen. Leider ist es histologisch nicht möglich gewesen diese zu unterscheiden. Signifikante Ansammlungen von Granulozyten im Sinne einer akuten Entzündungsreaktion waren nur im Präparat des Tieres 73 zu sehen. In Abb. 28 Bild 2 ist die Auflagerung klar zu erkennen, es handelt sich um amorphes Bindegewebe unklarer Herkunft. Es steht in keiner direkten Verbindung zur Klappe. Um diese Raumforderung herum hat sich ein hämorrhagischer Randsaum gebildet, in Bild 3 sind deutlich Erythrozyten zu erkennen. Innerhalb der amorphen Substanz lässt sich eine Vielzahl von segmentkernigen Zellen darstellen, höchstwahrscheinlich handelt es sich um Granulozyten.

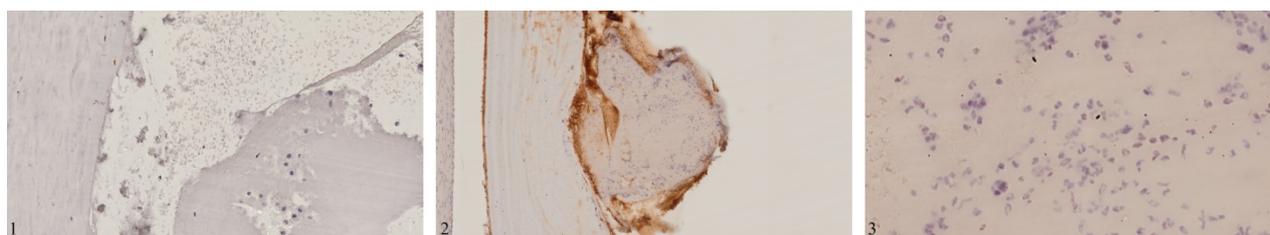


Abbildung 28: Histologische Präparate des Tieres 73 in der vWF und Hämalaun-Färbung.

3.5.5 Gewebeumbau

Die nicht implantierte dezellularisierte tissue-engineerten Herzklappe besteht aus einer amorphen Grundsubstanz, die sich in der Movat Pentachrom Färbung türkis/grünlich darstellte. Sie lässt sich in Abb. 29 Bild 1 noch sehr schön erkennen. Bereits nach zwei Wochen ist in diesem Bild deutlich zu beobachten, dass die Klappe und die Graftwand sehr gut miteinander verwachsen sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass diese Klappe höchst wahrscheinlich bereits im Bioreaktor angefangen hat, neues kollagenes Bindegewebe zu bilden, das sich als hellblaue Substanz zeigt. Nach acht Wochen zeigte sich ein weiterer Umbau des Gewebes, doch besonders

3. Ergebnisse

prägnant sind hier die sich rot darstellenden Fibrineinschlüsse, die sich über die ganze Klappe und Konduitwand verteilen. Am Ende des Versuchs nach 52 Wochen ließ sich die amorphe ECM Grundsubstanz nur noch in kleinen Teilen feststellen. Deutlich zu erkennen ist der kollagenöse Umbau, der sich in der Movat-Pentachrom-Färbung gelblich darstellt. Elastische Fasern wurden in keinem der untersuchten Präparate gefunden. Es besteht die Möglichkeit, elastische Fasern mit Hilfe der Elastika-van-Giesen-Färbung anzufärben, allerdings ist dies aufgrund des Plastic embeddings nicht möglich diese Färbung in das Kunstharz einzubringen. Es lassen sich durchaus Fasern erkennen, diese können aber nicht konkret abgegrenzt werden. Die grünliche Farbe kommt durch eine Vermischung von Glykoproteinen, die sich blau anfärben, und Kollagen, das sich gelb darstellt, zustande.

Movat Pentachrom Färbung

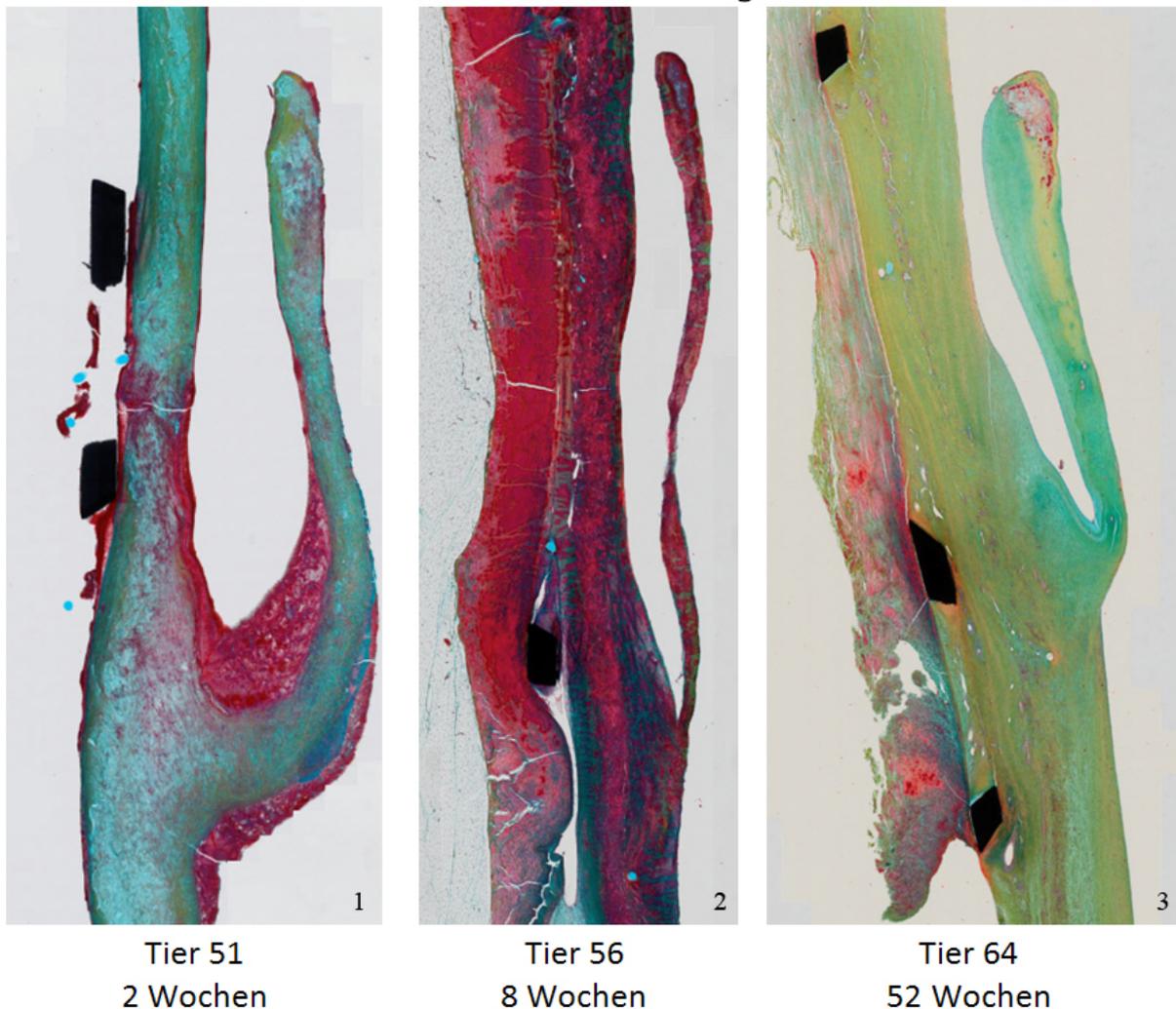


Abbildung 29: Extrazelluläre Matrix

Hier sind drei Klappen zu unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt. Es handelt sich um eine Movat Pentachrom Färbung, mit ihr lässt sich die Extrazelluläre Matrix beurteilen. Die Grundsubstanz ist hellblau, muskuläre Fasern zeigen sich rot, Kollagen wird gelb gefärbt und Glykoproteine stellen sich blau dar. Bereits in der zweiten Woche ist ein Umbau erkennbar, in der achten Woche ist schon fast nichts mehr von der Grundsubstanz zu erkennen. Nach 52 Wochen ist der Prozess soweit

3. Ergebnisse

abgeschlossen, dass das Bild auf zellulärer Ebene einer natürlichen Herzklappe ähnelt, auch wenn der Schichtaufbau einer nativen Klappe nicht erkennbar ist.

3.5.6 Verkalkung

Eine Von-Kossa-Färbung konnte nur exemplarisch an sechs Präparaten durchgeführt werden. Dabei fanden sich in keinem Fall Verkalkungen im Bereich der Graftwand oder in den umliegenden körpereigenen Geweben des RVOTs bzw. der Pulmonalarterie. Bei zwei Präparaten wurde durch die Färbung Kalk innerhalb der Klappe ausgemacht. Bei Tier 60 zeigte sich die Verkalkung im Klappenansatz und bei Tier 63 zart innerhalb der Taschenklappe, (s. Abb. 30).

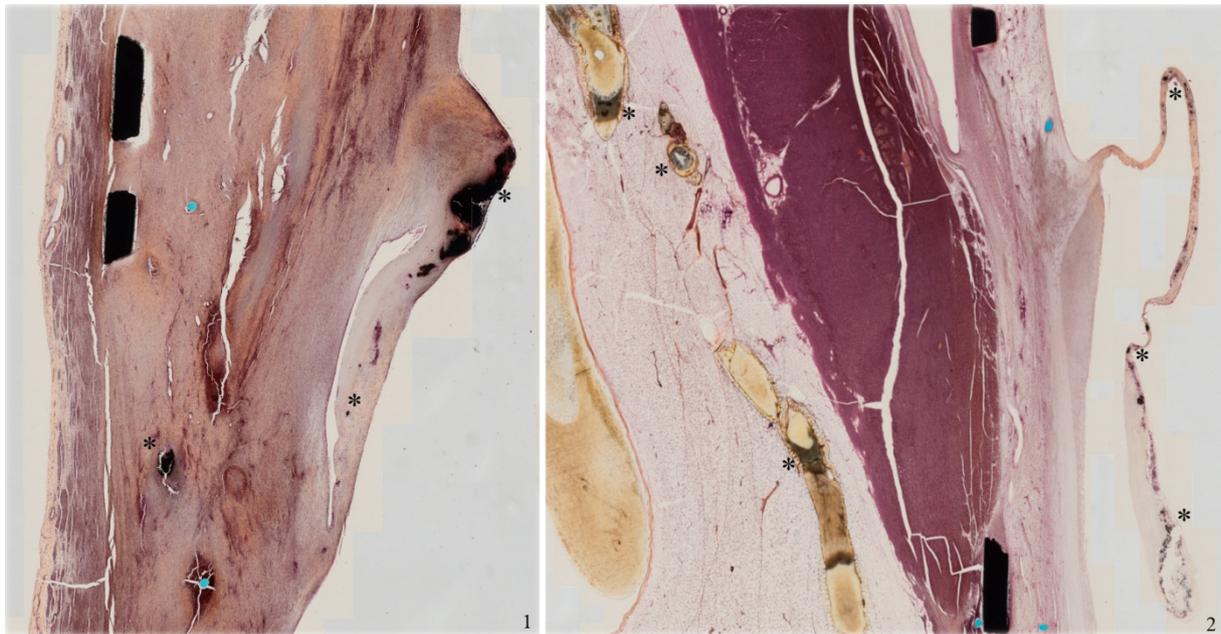


Abbildung 30: Verkalkung

von-Kossa-Färbung der Tiere 63 (1) und 60 (2). In der Klappenübersicht zeigen sich diffus verteilte, schwarze Verfärbungen (*), hierbei handelt es sich um positiv gefärbte Kalkablagerungen.

3. Ergebnisse

3.5.7 weitere Auffälligkeiten

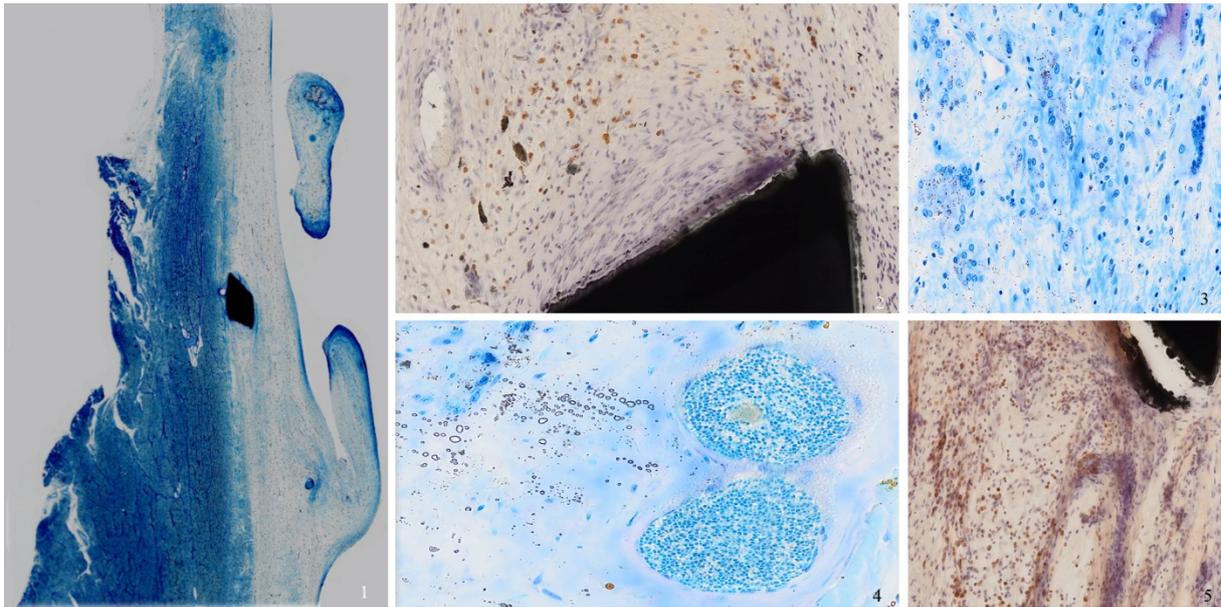


Abbildung 31: Übersicht der sonstigen, histologischen Auffälligkeiten.

Bild 1: Tier 58, Unterbrechung in der aortalen Tasche. Bild 2: Tier 63, CD3 positive T-Zellen die sich um eine Strentstrebe angesammelt haben, im Sinne einer Immunantwort auf das Fremdmaterial. Bild 3: Tier 57, diffuses Muster von Fremdkörperriesenzellen in der ganzen Wand ohne konkreten Fremdkörper oder Ursache. Bild 4: Tier 57, unklare Struktur im proximalen Teil der Klappe, ähnelt am ehesten einem Gefäß mit Erythrozyten, doch keine klare Gefäßwand abgrenzbar und mit 100µm auch deutlich zu groß. Bild 5: Tier 65, CD79 positive B-Zellen.

3. Ergebnisse

| Tiernummer | Verweildauer | Oberflächliche Endothelialisierung | | Neointima α -SMA | Einwachsen | | Entzündungsreaktionen* | | | Verkalkung** +/- | Neovaskularisierung | | Klappenrezessus +/- | Fibrinauflagerung Klappenrand | | Nekrose (PA-Wand) +/- | Stärke der Klappen-ta- sche μ m Spitze/Mitte/Prox in |
|------------|--------------|------------------------------------|------------------|----------------------------|--------------|----------------------|------------------------|-------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------|------------------------|-------------------------------|-----------------|--------------------------|---|
| | | Klappe +/- | Graftwand +/- | | Stent +/- | Scaffold – PA +/- | Granulozyten | Lymphozyten | Makrophagen/FKR | | Graftwand +/- | Klappe +/- | | Gewebe +/- | Thrombus +/- | | |
| 51 | 2 | +/- | +/- | - | n.u. | - | 0 | 0 | 0 | n.u. | - | - | +/- | + | - | - | 480/1000/1200 |
| 52 | 9 | +/- | +/- | ++ | + | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | + | - | - | 500/400/1200 |
| 54 | 8 | + | +/- | + | +/- | + | 0 | 1 | 1 | (-) | + | - | - | + | - | - | 550/400/250 |
| 56 | 8 | + | + | + | +/- | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - | 450/300/350 |
| 55 | 40 | + | + | + | + | + | 0 | 1 | 1 | (-) | + | - | - | - | - | - | 500/400/500 |
| 57 | 24 | + | + | + | + | + | 0 | 1 | 2 | n.u. | + | - | - | - | - | - | 400/600/800 |
| 53 | 62 | + | + | ++ | +/- | + | 0 | 0 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - | 800/430/240 |
| 58 | 54 | + | +/- | ++ | + | + | 0 | 1 | 1 | (-) | + | - | - | - | - | - | 600/800/600 |
| 60 | 40 | + | + | + | + | + | 0 | 1 | 1 | + | + | - | - | - | - | - | 400/300/500 |
| 61 | 52 | + | +/- | + | + | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - | 700/300/300 |
| 63 | 52 | + | + | ++ | +/- | + | 0 | 1 | 1 | + | + | - | - | - | - | - | 800/150/200 |
| 62 | 52 | + | + | + | + | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - | 500/400/400 |
| 64 | 52 | + | + | + | + | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - | 500/300/400 |
| 65 | 54 | + | +/- | + | +/- | + | 0 | 1 | 1 | (-) | + | - | - | - | - | - | 700/400/500 |
| 73 | 52 | + | ++ | + | +/- | + | 1 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - | 800/600/500 |
| 75 | 52 | + | ++ | + | +/- | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | + | - | - | - | 1000/800/400 |
| 100 | 52 | + | + | + | + | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | + | - | - | - | 500/400/380 |

598,8 \pm 171,3/
469,4 \pm 221/
518,8 \pm 294,9

3. Ergebnisse

Tabelle 11: Übersichtstabelle der histologischen Ergebnisse.

*Einschätzung der Entzündungsreaktion: 0 – nicht nachweisbar, 1 – gering ausgeprägt, 2 – mäßig ausgeprägt, 3 – stark ausgeprägt. ** Verkalkungen untersucht mittels von-Kossa-Färbung, jedoch nur bei den Tieren 60 und 63 mit Anteilen der Taschenklappen im gefärbten Schliffpräparat (beide positiv für Kalk). n.u. = nicht untersucht. Neointima: - nicht vorhanden, + vorhanden und Stärke < 300 µm, ++ vorhanden Stärke > 300 µm. FKR = Fremdkörperriesenzellen/Makrophagen

4. Diskussion

Die Nachfrage nach künstlichen Herzklappen ist sehr groß. So kommen 1% der Kinder mit angeborenen Herzfehlern auf die Welt [2]. Nicht alle dieser Kinder benötigen eine neue Herzklappe, da die Herzfehler auch andere Strukturen des Herzens betreffen können. Doch die Kinder, die eine künstliche Herzklappe erhalten, sind nicht geheilt, da alle bisher auf dem Markt verfügbaren Ersatzklappen, sowohl biologischer Art als auch mechanischer Art, nicht mit den Kindern mitwachsen, hat dies zur Folge, dass die jungen Patienten im Laufe der Zeit mehrfach am offenen Herzen operiert werden müssen, da die zu klein gewordene Klappe entfernt, und eine neue Klappe implantiert werden muss.

Doch auch für Erwachsene sind die auf dem Markt befindlichen Ersatzklappen keine endgültige Lösung, die neuen Klappen verkalken oder neigen dazu sich zu entzünden. Die Nachfrage wird in den nächsten Jahren deutlich ansteigen. So gibt es Kalkulationen, bei denen sich die Anzahl der jährlich weltweiten Herzklappenersatztherapien verdreifachen wird, von ca. 290.000 auf 850.000 [33].

Im Jahre 2000 gelang es erstmals einem 12-jährigen Jungen, mittels Katheter eine künstliche Herzklappe in Pulmonalposition zu implantieren [67]. Dieses Verfahren ist deutlich schneller durchführbar, mit weniger Risiken verbunden und die stationäre Nachsorge ist deutlich geringer als bei einer offenen Operation am Herzen. Dennoch zeigen diese Klappen ähnliche Probleme wie bei der operativen Variante. Sie zeigten viele Fälle von Stentbrüchen und in einigen Fällen kam es zu Entzündungsreaktionen [68].

Mittels des Tissue-Engineerings versuchten wir diese Probleme der Abstoßung durch das Immunsystem, des fehlende Wachstum und die Degeneration zu beseitigen. Durch das Verwenden von körpereigenen Zellen und der anschließenden Dezellularisation erhofften wir, dass das Immunsystem diese Klappen nicht als Fremdkörper betrachten würde und es so zu keiner Abstoßung bzw. Entzündungsreaktion kommen würde. Des Weiteren lassen sich die Klappen sehr einfach, in nahezu unbegrenzter Stückzahl und individuell auf den Patienten zugeschnitten anfertigen.

Ziel dieser präklinischen Studie war es, in der einjährigen Nachbeobachtungszeit die Bedeutung und Vorteile der dezellularisierten tissue-engineerten Herzklappe und der minimalinvasiven Implantationstechnik darzulegen.

4.1 Resümee der Ergebnisse

Die Versuchsreihe zeigte, dass es möglich ist, homologe dezellularisierte tissue-engineerte Herzklappen herzustellen und mittels der minimal invasiven Methode über einen venösen Zugang zu implantieren. Die Ablage der dTEHV war bei allen Tieren bis auf einem von 17 Tieren (Tier 60) erfolgreich. Bei dem beschriebenen Tier rutschte die Klappe kurz vor der Implantation zu weit nach distal in die Pulmonalarterie, sodass die native Pulmonalklappe nicht überstentet wurde und das Tier anschließend eine Doppelklappe besaß. Bei drei weiteren Tieren wurde die Klappe ebenfalls zu weit distal abgelegt, bei diesen Tieren wurde die native Klappe aber komplett überstentet. Hier zeigte sich keine Behinderungen der Strömungseigenschaften der Klappe.

Ein weiteres Problem, das relativ häufig auftrat, war das Verhaken der Stentspitze beim Zurückziehen nach der Implantation. Bei zwei Klappen zeigte sich in der anschließenden intrakardialen Echokardiographie, dass eine der Taschen eingerissen worden waren. Unklar ist aber ob die Beschädigungen bereits durch das Crimping verursacht wurden, oder ob die Klappen beim Zurückziehen des Implantationskatheters beschädigt wurden. Bei der Implantation kam es in drei Fällen ebenfalls zu einem Verhaken des Katheters. Hier blieben die Klappen aber unbeschädigt.

In der intrakardialen Echokardiographie wurden anschließend die Insuffizienzgrade bestimmt. Sie werden von 0 (keine Insuffizienz) bis 3 (schwere Insuffizienz) unterteilt. Direkt nach der Implantation hatten zehn der 15 Klappen einen Insuffizienz Grad 0, zwei in Grad 1 und drei in Grad 2. Im Verlauf des Follow-ups nahm die Insuffizienz der Klappen geringfügig zu, doch die Funktion der Klappen war nach wie vor erhalten und gut. Von den zehn Tieren, die das komplette Follow-Up von 52 Wochen absolvierten, hatten sechs Klappen eine milde Insuffizienz, zwei eine moderate und eine keine Insuffizienz. Des Weiteren wurde die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) direkt über der Klappe bestimmt. Auch hier waren die Ergebnisse sehr zufriedenstellend, es zeigten sich keine pathologischen Flussbeschleunigungen und der Median lag während des gesamten Follow-ups unter 1,5 m/s.

Um die Funktion der Klappen noch besser zu beurteilen, erhielten die Tiere in regelmäßigen Abständen ein MRT Flussmessung. Hier wurde die Regurgitationsfraktion (RF) bestimmt, der Median der RF von allen Tieren bewegte sich über den gesamten Zeitraum der Studie unter der 15% Marke.

Die Ergebnisse aus der ICE und der MRT sprechen für eine sehr gute Klappengeometrie mit physiologischen Strömungseigenschaften. Es zeigte sich in keiner Untersuchung ein Anhalt für eine Stenosierung der Klappe.

4. Diskussion

In der makroskopischen Beurteilung der dTEHV in Pulmonalposition zeigte sich, dass die Taschen von insgesamt sechs Klappen beschädigt waren, dies ist wahrscheinlich durch das Zurückziehen des Katheters oder durch das Crimping zu erklären. Ebenfalls in sechs Präparaten war zu beobachten, dass die Stentspitzen die Pulmonalarterie durchspießt hatten. Besonders in der Hinge-Region der Klappen können sich aufgrund der ungünstigen Strömungsverhältnisse Thromben bilden [109], makroskopisch war in keiner der nach 52 Wochen explantierten Klappen ein Thrombus zu sehen. In der Histologie zeigten sich in drei Präparaten Thromben. Bei diesen drei Klappen handelt es sich um Klappen der ersten Versuchsreihe, die bereits nach zwei, acht bzw. neun Wochen explantiert werden mussten, so dass es sich hierbei auch um Umbau Artefakte handeln kann. Die Endothelialisierung der dTEHV wurde ebenfalls histologisch beurteilt, bereits in den früh explantierten Präparaten war eine Endothelschicht zu erkennen, auch wenn sie noch nicht vollständig vorhanden war. Sonst wurden keine größeren Ansammlungen von Immunzellen beobachtet. Nur in einem Fall fand sich eine Auflagerung auf einer Tasche, der Ursprung dieser Auflagerung ist nicht zu klären gewesen. Sie ist zwar mit der Klappe verwachsen, allerdings ist er wie von einer Kapsel umgeben. Die dezellularisierte Klappe wurde im Laufe des Follow-ups neu besiedelt und auch die Extrazelluläre Matrix wurde neu gebildet. In zwei Präparaten fand sich Kalk.

4.1.1 Crimping

Nach anfänglichen Problemen mit der Stabilität der Klappentaschen in den ersten Versuchsgruppen wurde in den Versuchsreihen 3 und 4 die Form des PGA-Scaffolds geändert und der Scaffold erst nach zehn bzw. 13 Tagen in den Bioreaktor eingelegt.

Durch diese Änderungen resultierte eine deutlich bessere Stabilität. Bei den darauffolgenden Klappen kam es durch das Crimping oder die Implantation zu keinen weiteren Beschädigungen. Für die minimalinvasive Implantationstechnik ist das Crimping unabdingbar. Die Klappe muss in eine 8-10 mm große Kapsel eingebracht werden, um sie anschließend über eine venöse Schleuse in die Blutbahn einzubringen. Die Arbeitsgruppe um Dr. Kiefer untersuchte die Auswirkungen des Crimpings auf die Herzklappen [71]. Sie zeigte, dass es durch das Crimping zwar nicht zu vermehrter Kalzifizierung der Klappe kommt, in der Histologie jedoch sich deutliche zelluläre Umbauten und Veränderungen in den Kollagenfasern vorzufinden sind. Dieser Prozess ist verstärkt zu beobachten, wenn die Klappen über eine lange Dauer auf einen kleinen Durchmesser gecrimpt werden [110]. Aus diesem Grund wurden die dTEHV erst kurz vor der Implantation gecrimpt und in den Implantationskatheter eingelegt, um die Dauer möglichst gering zu halten. Des Weiteren wurden die Klappen nicht so klein wie möglich gecrimpt, weil auf

4. Diskussion

dies der Klappe schadet. Im Durchschnitt befanden sich die Klappen $46,82 \pm 26,87$ Minuten im gecrimpten Zustand. Hieraus resultiert die Dauer, in der sich die Klappe im gecrimpten Zustand befindet, sollte möglichst kurz sein.

4.1.2 Implantation

Bis zur Jahrtausendwende war die einzige Möglichkeit, eine defekte oder erkrankte Pulmonalklappe zu ersetzen, den Thorax zu eröffnen, die Klappe operativ zu entfernen und eine Klappenprothese zu implantieren [67]. Die transkutane-minimalinvasive Implantationstechnik bietet gegenüber der operativen Methode viele Vorteile, so lassen sich die Krankenhausaufenthaltsdauer, die Kosten, das Risiko von Komplikationen, die Schmerzen und Narbenbildung deutlich reduzieren [65].

Die Arbeitsgruppe LifeValve war die erste, der es gelang eine komplette tissue-engineerte Herzklappenprothese über einen venösen Zugang zu implantieren [111]. Anderen Arbeitsgruppen, wie z.B. Driessen-Mol, gelang die Implantation bereits über einen transapikalen Zugang [51]. Bei dieser Methode wird ein Zugang über einen Zwischenrippenraum auf Höhe der Herzspitze frei präpariert und über diesen mittels Seldinger-Technik der Implantationskatheter eingeführt. Diese Methode wird zwar auch am Menschen angewandt, birgt aber auch ein deutlich höheres Risiko, die nahegelegenen empfindlichen Strukturen, wie Nerven, Gefäße oder die Lunge zu verletzen [112].

Beim Menschen wird die minimalinvasive-transvenöse Implantation in der Regel über die Vena femoralis durchgeführt, aufgrund der sehr kaliberschwachen v. femoralis war dies beim Schaf aber nicht möglich. Deshalb wurde die Klappe in dieser Studie über die Vena jugularis implantiert. Die Größe der V. femoralis reicht nicht aus, um den Katheter einzubringen, in der V. jugularis war dies komplikationslos möglich. Das Problem an dem Zugang über den Hals war, dass das Ablagesystem sehr flexible sein musste um durch den Vorhof in die rechte Herzkammer und anschließend in den RVOT zu gelangen und hier keine der empfindlichen Strukturen wie die Trikuspidalklappe zu verletzen. Dies erwies sich bei manchen Implantationen durchaus als Herausforderung. Bei dem oben bereits beschriebenen Verhaken, das bei manchen Klappen aufgetreten ist, kann es sich auch um genau den Moment handeln, in dem der Implantationskatheter maximal gekrümmt war. Dadurch wurde die Spitze des Katheters fest gegen die Wand des RVOTs gedrückt. Beim zurück ziehen des Katheters bzw. beim Ablegen der TEHV bemerkte man ein ruckartiges Lösen, da die Biegung am Katheter nicht mehr so stark war [113]. Trotz dieses ruckartigen Lösens kam es zu keinen Beschädigungen der umliegenden Strukturen. Falls wie beim Menschen üblich ein Zugang über die Leiste gewählt wird, muss der Katheter

4. Diskussion

deutlich länger sein und ähnliche flexible Eigenschaften wie der verwendete Katheter aufweisen um an die gewünschte Ablageposition zu gelangen.

Um die dTEHV überhaupt implantieren zu können, musste sie in einen Stent eingenäht werden, hier werden prinzipiell zwei unterschiedliche Modelle verwendet: selbstexpandierende und ballongestützte Stents. Wir entschieden uns für das selbstexpandierende Modell, da sich diese Stents besser an die vorhandenen anatomischen Gegebenheiten anpassen können und man die umgebenden Strukturen weniger beschädigt. T. W. Duerig et al verglichen bereits diese beiden unterschiedlichen Stentarten und kamen zu dem Ergebnis, dass die Klappe durch die Ballonexpansion beschädigt werden kann [114]. Da die Klappen bei der Ballonexpansionsmethode ebenfalls gecrimpt werden müssen und durch das Crimping ebenfalls Schäden auf zellulärer Ebene, sowie strukturell auftreten können, lässt sich nicht differenzieren, wodurch die Schäden aktuell entstanden sind.

Bei allen Tieren konnte die Klappe mit der minimalinvasiven-transvenösen Implantationstechnik erfolgreich implantiert werden. Bei drei Tieren traten allerdings Probleme auf. Ein Tier erhielt direkt nach der Ablage der dTEHV Kammerflimmern und konnte trotz erfolgter Reanimation nicht wiederbelebt werden. Gelegentlich traten Extrasystolen bei den anderen Tieren auf, ansonsten wurden keine Herzrhythmusstörungen beobachtet. Diese Extrasystolen, meist supraventikuläre, waren selbstlimitierend und somit auch hämodynamisch irrelevant. Bei zwei anderen Tieren rutschte die Klappenprothese während der Ablage zu weit in die Pulmonalarterie nach distal. Die native Pulmonalklappe wurde nicht überstentet und das Tier hatte anschließend eine Doppelklappe.

Da die Implantation am schlagenden Herz stattfand, bewegte sich der Katheter durch den Blutstrom und die Klappenebene verschob sich durch die Herzbewegung während der Systole und Diastole. Außerdem gab es keine Möglichkeit, die Ablage des klappentragenden Stents abbrechen, sobald der Stent aus seiner Kapsel über ein gewisses Maß herausgeschoben wurde. Hier zeigt sich ein Vorteil der ballonexpandierenden Stents. Mit diesen ist es möglich, die Ablage zu korrigieren, auch wenn man den Ballon bereits begonnen hatte aufzupumpen.

Bei einigen Tieren ließ sich das Ablagesystem nicht zurückziehen und so der Stent mit der Klappe nicht frei geben. Teilweise musste der Katheter neu geladen werden, dadurch wurden die Probleme behoben. Anzunehmen ist, dass sich das Nahtmaterial und die Knoten in der Kapsel verhakt hatten. Alternativ gibt es die Möglichkeit die Klappe mit dem Stent zu verkleben oder zu tackern. Besonders beim Tackern besteht ebenfalls die Gefahr das sich die Tackernadeln wie das Nahtmaterial im Ablagesystem verkanten. Eine andere Möglichkeit für dieses

4. Diskussion

Problem könnte sein, dass die dTEHV zu dick war und damit die Reibung zwischen Ablagesystem und der Klappe zu hoch war.

Um eine exaktere Ablage zu gewährleisten, könnte die Herzfrequenz der Tiere für eine kurze Zeit medikamentös (Adenosin) gesenkt werden. Das würde die Verschiebung der Klappen-ebene zwar nicht unterbinden, aber man hätte mehr Zeit für die genaue Positionierung der Klappe. [77]

Nicht nur durch eine Verlangsamung der Herzfrequenz, sondern auch durch eine kurzfristige Erhöhung der Herzfrequenz wäre eine Alternative, um eine genauere Ablage der zu implantierenden Klappe zu ermöglichen. Dies hat unter dem Begriff „overpacing“ oder „rapid pacing“ Einzug in die Klinik erhalten. [78]

Eine weitere Überlegung wäre ein System in den Katheter einzubauen, das es erlauben würde, den Implantationsprozess abubrechen bzw. zu korrigieren.

4.1.3 Beschädigungen der Klappen

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben, kam es bei den ersten beiden Klappengruppen zu Beschädigungen der Taschen bei den Schafen 52-56, sowie 58 und 61. Diese Schäden entstanden entweder durch das Verhaken des Implantationskatheters beim Zurückziehen durch die dTEHV oder teilweise auch schon durch das Crimpen. Um diese Probleme zu beheben, wurde bereits in der Vorläuferstudie die Spitze des Implantationskatheters modifiziert. Die Rückseite der Spitze des Ablagesystems wurde abgeflacht, um ein Verhaken zu verhindern. Des Weiteren wurde die Geometrie der Klappe geändert und die Besiedlungsdauer im Bioreaktor angepasst. Erfreulicher Weise zeigten die Klappen der neuen Generation trotz der Beschädigungen eine gute Funktion und mussten nicht vorzeitig explantiert werden. Durch diese Änderungen traten in den beiden letzten Klappengruppen keine Beschädigungen mehr auf.

4.1.4 Funktion der dTEHV

Direkt nach der Implantation wurde mittels ICE die Funktion der Klappen bestimmt. Insgesamt war die Funktion der Klappen nach der Implantation sehr gut. Obwohl viele Klappen der ersten beiden Generationen direkt bei der Implantation beschädigt worden waren, wurde keine schwere Insuffizienz festgestellt. Lediglich zwei Klappen wurden als moderat insuffizient eingestuft. In anderen Studien wurde beschrieben, dass die Klappen sich im Laufe der Zeit immer mehr verkürzten und mit der Pulmonalwand verwachsen [51]. In den ersten beiden Klappengenerationen konnte eine Verkürzung der Klappen noch beobachtet werden teilweise waren die

4. Diskussion

beschädigten Taschen auch mit der Wand verwachsen. Durch die längere Anzucht im Bioreaktor konnte die Stabilität der Klappen verbessert werden und die Probleme so behoben werden. Direkt über der Klappe wurde die maximale Geschwindigkeit während der Systole bestimmt. Über das komplette Follow-up hinweg, konnten sowohl im MRT als auch mittels ICE keine Flussbeschleunigungen oder erhöhter Druckgradient festgestellt werden. Hieraus lässt sich ableiten, dass es weder zu Insuffizienz sowie Stenosierung der implantieren dTEHVs kam.

4.1.5 Makroskopie

Nach der Explantation und Präparation zeigten sich die Klappen mit einer glatten, weißlich-glänzenden Oberfläche, in einem Fall gab es sichtbare Auflagerung. In vielen Klappen wurden rötliche bis bräunliche Verfärbungen beobachtet, hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Mikrotraumen, im Sinne von Hämatomen, die durch den Katheter entstanden. Im Bereich des Randes der Klappen zeigten sich unterschiedlich stark ausgeprägte Verdickungen, diese entstanden wahrscheinlich durch Umbauprozesse und schienen keinen negativen Einfluss auf die Funktion zu haben.

Alle dTEHV zeigten ein sehr gutes Einwachsen in die native Gefäßwand. Besonders in der Hinge-Region, der tiefsten Stelle einer Tasche, können sich Thromben bilden [109], dies wurde jediglich in den Klappen der ersten Generation beschrieben. Hierbei handelt es sich um die Tiere 51, 52 und 54, die Klappen diese Tiere wurden nach zwei, neun, bzw. acht Wochen entfernt. Da es zu keinen thrombolischen Ablagerungen kam bei den Tieren, die erst nach 52 Wochen entfernt wurden, handelt es sich hierbei wohl um ein Phänomen der Rebesiedlung der dTEHV

Da alle Tiere in dieser Studie Stents der gleichen Größe erhielten, wurde in insgesamt sechs Fällen eine Perforation der Stentspitzen durch die Pulmonalarterie beobachtet. Da die Pulmonalarterie zum Zeitpunkt der Explantation nicht mehr mit Blut gefüllt war und somit kollabierte, zeigte sich das Hervortreten der Stentspitzen noch deutlicher. Zwar wurde vor der Implantation durch ein CT die Größe der Pulmonalklappe bestimmt, es konnten aber keine individuell angefertigten Klappen hergestellt werden. In den Verlaufsuntersuchungen mittels MRT und CT zeigten sich keine Perforationen der Pulmonalarterie. Deshalb ist davon auszugehen, dass es erst durch die Explanation zu den beschriebenen Perforationen kam. Für eine Anschlussstudie bzw. die Verwendung im Menschen wäre eine individuelle hergestellte Klappe unbedingt erforderlich um das Risiko dieser Komplikation zu minimieren. Wahrscheinlich wurde auch die Radialkraft des Stents unterschätzt und so kam es zur Perforation der Pulmonalarterie. Dies ist aber sehr schwierig einzuschätzen und eine zu geringe Radialkraft würde zur Folge haben, dass

4. Diskussion

der Stent zu locker sitzt oder sich sogar lösen könnte, was eine operative Entfernung der Klappe nach sich ziehen würde.

4.1.6 Histologie

Anhand der histologischen Untersuchung sollte beurteilt werden, inwieweit die vor der Implantation dezellularisierte Klappe wieder mit neuen Zellen besiedelt wurde. In allen Präparaten zeigte sich eine gutes Einwachsverhalten, sowie eine Wiederbesiedlung der dezellularisierten tissue-engineerten Herzklappe.

4.1.6.1 Einwachsen und Position des klappentragenden Stents

In 56,25 % (9/16) der Fälle verwuchs die dTEHV komplett mit der nativen Pulmonalwand. In drei Fällen (Tier 65, 73 und 75) wurde die Klappe zu weit distal implantiert. Die native Pulmonalklappe wurde zwar überstentet, allerdings nicht in der Mitte des Stents, sodass der Scaffold nicht komplett anliegen konnte. In vier weiteren Präparaten wurde gesehen, dass die Klappe nicht komplett mit der Wand verwachsen war. Da in den durch die inkomplette Adaptation gebildeten Hohlräumen unphysiologischen Strömungsverhältnisse herrschten, bilden sich dort gerne Thromben [109]. Das wurde aber in keinem Präparat beobachtet.

4.1.6.2 Endothelialisierung

Mechanischen Klappen besitzen keine Endothelschicht, deshalb benötigen Patientin mit einem mechanischen Herzklappenersatz eine lebenslange Antikoagulation zur Vermeidung von thromboembolischen Ereignissen. Patientin die eine biologische Klappe erhalten benötigen ebenfalls eine Antikoagulation für mindestens 90 Tage [115]. In mehreren Studien konnte zwar ein neu gebildetes Endothel nachgewiesen werden, dies war in der Regel aber lückenhaft und bedeckte nicht die ganze Oberfläche der tissue-engineerten Klappe [51,109]. In all unseren explantierten Klappen konnte durch die immunhistochemische Färbung mit Anti-von-Willebrand-Faktor eine neu gebildete Endothelschicht beobachtet werden. Zwar zeigten die Klappen der Tiere die vorzeitig explantiert werden mussten (< 8 Wochen), keine komplette Endothelschicht, doch die Endothelialisierung hatte bereits auch dieser kurzen Zeit begonnen. Aber bereits nach zwei Wochen zeigte die Klappe des Tieres 51 eine dezente, aber unvollständige Endothelschicht. Die Endothelialisierung im Bereich der Graftwand war in den Präparaten ausge-

4. Diskussion

prägter als an der Klappe selbst. Zwischen der ventrikulären Seite und der Seite, die dem Ausflusstrakt zugewandt war, konnte kein Unterschied festgestellt werden. Dies ist wohl auf die unterschiedlichen Strömungsverhältnisse an den verschiedenen Stellen zurückzuführen.

4.1.6.3 Remodelling der dezellularisierten tissue-engineerten Klappe

Nach der minimalinvasiven Implantation mussten in der dezellularisierten Klappe zwei wichtige Prozesse ablaufen. Zum einen musste die Klappe den bioresorbierbaren PGA-Scaffold abbauen und zum anderen mit neuen Zellen besiedelt werden. Diese beiden Schritte des Ab- und Aufbaus sind entscheidend für die Entwicklung und somit auch für die Funktion der Klappe. Das sogenannte „Matrix Turnover“ wird durch die Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (TIMPs) reguliert [116]. In der histologischen Färbung mit α -SMA zeigte sich bereits nach wenigen Wochen ein gutes Einwanderungsverhalten von Myofibroblasten in die dTEHV, die sich nach acht Wochen noch sehr spärlich zeigten, aber in den nach 52 Wochen explantierten Präparaten eine komplette Besiedelung der Konduitwand und der Klappe zeigten. Durch eine durchgeführte DNA-Quantifizierung konnte der DNA-Gehalt der dTEHV mit einer nativen Klappe verglichen werden. Dieser lag zwischen 20 – 25 % des eigentlichen DANN-Gehaltes einer nativen Pulmonalklappe.

Eine natürliche Pulmonalklappe besteht aus verschiedenen Schichten, der Lamina fibrosa, Lamina spongiosa und der Lamina ventrikularis. Diese Schichten enthalten dieselben gleichen Bestandteile, unterscheiden sich aber in der Zusammensetzung und in ihrer Stärke [17]. In den dezellularisierten tissue-engineerten Herzklappen war in der histologischen Untersuchung eine neu gebildete extrazelluläre Matrix klar zu erkennen, allerdings nicht in dem schichtweisen Aufbau, wie man ihn aus einer nativen Herzklappe kennt. Die ECM bestand hauptsächlich aus Kollagen. Elastische Fasern wurden in keinem Präparat gefunden. Zwar konnten faserähnliche Strukturen beobachtet werden, diese ließen sich aber nichteindeutig identifizieren. Es gibt zwar die Möglichkeit, elastische Fasern mittels der darzustellen, dies war aber aufgrund des Herstellungsverfahrens der Schnitte mittels Plastic embedding nicht möglich. Bei diesem speziellen Verfahren wird das Präparat in Harz eingebettet und anschließend in dünne Scheiben für die Mikroskopie geschnitten und geschliffen, das Einbringen der Elastika-van-Giesen-Färbung ist aber technisch nicht möglich. In anderen Studien konnten aber bereits elastische Fasern nachgewiesen werden [51][82]. Da, es wie oben beschrieben, die spezifische Methode zur eindeutigen Bestimmung nicht durchgeführt werden konnte, aber Fasern generell entdeckt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass elastischen Fasern vorhanden waren. Für eine genauere Beurteilung dieser Fasern wäre es ideal in einem weiteren Projekt die Elastika-van-Giesen-

4. Diskussion

Färbung in die Methodik einzuschließen. Alternativ wäre auch eine Untersuchung mittels Elektronenmikroskopie denkbar.

In allen untersuchten Präparaten waren Entzündungsreaktionen nachweisbar. Es fanden sich lose verteilte Lymphozyten oder auch lymphozytäre Infiltrationen im neu gebildeten Gewebe, ohne unmittelbaren Kontakt zum Scaffold oder zu den Metallstreben der Stents, die am ehesten als Ausdruck des Gewebeumbaus zu werten sind. In der Regel waren die lymphozytären Infiltrationen jeweils gemischt B- und T-lymphzellulär. In keinem Fall wurde eine ausgeprägte Invasion von Lymphozyten, im Sinne einer Endokarditis, innerhalb eines Präparates gesehen. In allen Präparaten zeigte sich eine Fremdkörperreaktion im Bereich des Scaffolds der Graftwand mit Ansammlung von Makrophagen (Histiozyten) und Ausbildung von Fremdkörper-Riesenzellen. In einigen Fällen fand sich eine Fremdkörperreaktion auch an den Metalloberflächen der Stentstreben. Signifikante Ansammlungen von Granulozyten im Sinne einer akuten Entzündungsreaktion waren in keinem der Präparate nachweisbar, bis auf eine Ausnahme. Bei einem Tier (73) fand sich an der Außenseite der Klappe eine homogene Auflagerung. In dieser Auflagerung fanden sich zahlreiche eingelagerte Lymphozyten und Granulozyten. Die Oberfläche der Klappe wurde nicht durch die Auflagerung infiltriert, außerdem wurde die Auflagerung durch einen hämorrhagischen Randsaum umgeben. Hierbei handelt es sich am ehesten um eine primäre Endokarditis, allerdings mit sehr untypischer Lokalisation und Erscheinung. Eine weitere Erklärung für diese Auflagerung wäre eine septische Absiedelung.

Die neu gebildete Schicht zwischen Endothel und Scaffold nennt sich Neointima, sie wurde mit nur einer Ausnahme in allen Präparaten gebildet. Hierbei handelt es sich um α -SMA positive, spindelförmige Myofibroblasten, die von Extrazellulärer Matrix umgeben waren. Die Stärke dieser Schicht war sehr unterschiedlich. Wahrscheinlich hängt die Dicke der Schicht mit der mechanischen Beanspruchung an gewissen Abschnitten der dTEHV zusammen.

In der Graftwand der dTEHV fanden sich regelmäßig neue Gefäßeinsprossungen. In der Klappe selbst wurden keine Gefäße entdeckt, dies war auch nicht zu erwarten, da sich auch nur sehr selten in nativen Klappen Gefäße finden. Die Versorgung der Klappentaschen und -Segeln erfolgt über Diffusion direkt aus dem Blut.

Insgesamt waren der Prozess des Remodellings und die zu Anfang beschriebenen Prozesse des Abbaus des bioresorbierbaren PGA-Scaffolds und die anschließende Wiederbesiedlung in dieser Studie sehr zufriedenstellend. Es konnten nur vereinzelt in der Klappenspitze Reste des Scaffolds nachgewiesen werden, diese schienen aber keinen Einfluss auf die Funktion oder das Immunsystem zu haben, da sich an den Scaffoldresten keine Immunzellen ansammelten. Auch wenn der natürliche Aufbau der Extrazellulären Matrix in seinen verschiedenen Schichten nicht

4. Diskussion

hergestellt wurde, scheint die neue Bildung von Kollagen und anderen Bestandteilen eine gute Funktion der Klappe zu ermöglichen. Ein häufiges Problem mit Herzklappenprothesen ist die Entzündungsgefahr [117]. Die in einem Tier beobachtete Auflagerung ist zwar als Endokarditis zu deuten, dennoch ist unklar welcher Genese sie entstammt.

4.1.6.4 Thromben

In der Hinge-Region der Klappen der Tiere 51, 52 und 54 wurden thrombotische Auflagerungen entdeckt. In allen anderen Klappen wurden keine Thromben gefunden, dies spricht für eine sehr gute Geometrie der Klappen mit physiologischen Strömungsverhältnissen. Da die Klappen der beiden Tiere frühzeitig explantiert werden mussten, nach zwei bzw. acht Wochen, scheint die beschriebene thrombotische Einlagerung im Zusammenhang mit dem Umbau und der Bildung der neuen Endothelschicht in Verbindung zu stehen. Die beschriebenen Thromben waren teils von einer dünnen unvollständigen Endothelschicht überzogen und bei den histologischen Untersuchungen bei den Tieren die das Follow-up von 52 erreichen konnten solche thrombotischen Veränderungen nicht mehr beobachtet werden.

Bei den Tieren, bei denen die Adaptation des Scaffolds und der Pulmonalwand nicht komplett war, entstanden Hohlräume, in denen wurden keine Thromben gefunden wurden. In der histologischen Beurteilung waren diese Räume leer. Was sich in vivo darin befand, kann im Nachhinein nicht eindeutig festgestellt werden.

4.1.6.5 Verkalkung

Eines der Hauptprobleme der biologischen Klappen ist die häufige und schnelle Verkalkung [53]. Von sechs Klappen wurde exemplarisch eine Von-Kossa Färbung angefertigt, mit der sich Kalk anfärben lässt. In zwei von sechs untersuchten Klappen wurde Kalk entdeckt. Da Schafe einen erhöhten Kalziumstoffwechsel besitzen [102], ist nicht auszuschließen, dass es sich um ein schafspezifisches Phänomen handelt. Die Verkalkungen traten sowohl in der Klappe selbst als auch in der Conduitwand auf.

4.2 Vergleich mit ähnlichen Studien

Bereits im Jahre 1995 stellte die Arbeitsgruppe um Shinoka et al. eine autologe, tissue-engineerte Herzklappentasche her, die anschließend in ein 20 Tage altes Lamm implantiert wurden [81]. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass es möglich ist eine TH-Herzklappentasche herzustellen und diese zu implantieren.

4. Diskussion

Das Verfahren der Dezellularisierung hat bereits Einzug in den klinischen Alltag gehalten. In mehreren Studien konnte aber gezeigt werden, dass diese neuen dezellularisierten Grafts funktionell schlechter abschneiden als die bisher verwendeten Klappen aus den Kontrollgruppen [90–92]. Die Kombination aus Dezellularisierung und autologem Tissue-Engineering konnte in unserer Arbeit erfolgreich kombiniert werden und die Klappen zeigten auch nach Ende des Follow-ups von 52 Wochen eine gute Funktion und keine Anzeichen für Stenosierung.

In anderen Arbeiten wurden bereits dezellularisierte tissue-engineerten Herzklappenprothesen über die minimalinvasive transapikale Technik implantiert [51,109]. Unsere Studie zeigte aber die erste erfolgte Implantation einer dTEHV über einen transvenösen Zugang. Driessen-Mol et al implantierten ebenfalls eine dTEHV in Schafe und untersuchten die Klappen nach 24 Wochen. In der anschließenden histologischen Untersuchung der Klappen fiel auf, dass die neu gebildete Endothelschicht zwar vorhanden war, sie aber noch häufig Lücken aufwies oder war dünn war, zudem zeigte sich Funktional im Verlauf eine zunehmende zentrale Insuffizienz der Klappen [51]. Unsere Studie zeigte hingegen bei vielen Präparaten eine komplett und durchgehende neu gebildete Endothelschicht und eine deutlich mildere Insuffizienz.

4.3 Das Schaf als Tiermodell

In den Anfängen der kardiovaskulären Forschung, mit dem Schwerpunkt Herzklappen, wurden verschiedene Tiermodelle wie Hunde, Kälber, Nager oder Schweine verwendet. Heutzutage ist das Schaf das Tiermodell der ersten Wahl in der Herzklappenforschung [82, 83]. Aus kardiovaskulärer Sicht sind sich das Schaf und der Mensch sehr ähnlich [85]. Anatomisch ist das Herz, mit den Klappen und den großen Gefäßen identisch und auch die Größenverhältnisse sind sehr ähnlich. Ein Unterschied ist allerdings, dass der RVOT des Schafes deutlich länger ist als beim Menschen. Physiologische Parameter wie Blutdruck, Herzfrequenz, intrakardialer Druck und Herzzeitvolumen sind ebenfalls sehr ähnlich [84]. Bei jungen Schafen konnte in mehreren Studien ein erhöhter Kalziumstoffwechsel beobachtet werden. Deshalb zeigen sich im Schaf relativ schnell Verkalkungen, die sich im Menschen erst nach mehreren Jahren beobachten lassen würden [102].

Ein weiterer großer Vorteil ist, dass Schafe einfach in der Haltung sind und ohne Probleme in größeren Gruppen in einem Stall untergebracht werden können. Außerdem lassen sie sich gut intubieren und narkotisieren[86].

Immer wieder wurde daran gezweifelt, ob das Schaf ein geeignetes Tiermodell für die kardiovaskuläre Forschung sei. So zeigte sich in mehreren Studien, dass Schafe zu einer stark überschießenden Fibrosierung an Klappenimplantaten neigten [118]. Dieser Prozess könnte die

4. Diskussion

schnelle Bildung der Neointima erklären, die sich in dieser Studie bereits nach sehr kurzer Zeit nachweisen lies und nur in einem Tier nicht vorhanden war. Um auszuschließen, dass die neue entstandene Neointima durch dieses Phänomen hervorgerufen wird, wäre eine Vergleichsstudie mit einem anderen Tiermodell, z.B. Schweinen, nötig.

Das verwendete Tiermodell stellt zwar eine gute und aussagekräftige Methode zur Erprobung der dezellularisierten tissue-engineerten Klappe dar, lässt sich aber aufgrund der oben beschriebenen Gegebenheiten nicht komplett auf den Menschen übertragen. Für eine Langzeiterprobung und genauere Vorhersage von Verkalkungen und Endothelialisierung ist eine in vivo Studie am Menschen oder Schweinen unabdingbar.

4.4 Limitationen

Die Resultate dieser Arbeit lassen sich nicht direkt auf den Menschen übertragen, auch wenn das Schaf aus kardiovaskulärer Sicht dem Menschen sehr ähnelt. Wie bereits in Abschnitt 4.3 erklärt, haben Schafe einen beschleunigten Kalziumstoffwechsel und neigen deshalb eher zu Verkalkungen. Um zu zeigen, dass es sich um ein schafspezifisches Phänomen handelt, wäre eine Vergleichsarbeit in einem anderen Tier, wie z.B. dem Schwein notwendig. Dies gilt auch für die teilweise stark ausgeprägt Neointima-Schicht.

Die Grundidee dieser Arbeit war es, eine neue Klappe für Kinder mit angeborenen Herzfehlern zu entwickeln. Da es sich bei diesen Patienten oft um schwer kranke Kinder handelt, finden sich am Herzen bereits immer vorbestehende Schäden. Für diese Studie wurden aber gesunde und ausgewachsene Schafe verwendet. Bei vielen angeborenen Herzfehlern kommt es zu einer fehlerhaften Herzentwicklung, dadurch könnte eine Implantation durch die anatomischen Gegebenheiten erschwert sein, bzw. über den minimalinvasiven Weg nicht durchgeführt werden. Vor der Implantation wurde die Größe des Durchmessers an der Pulmonalklappe bestimmt, die Maße betragen im Mittel $21,60 \text{ mm} \pm 1,64 \text{ mm}$ (s. Tabelle 6).

Dennoch erhielten alle Tiere eine dTEHV der gleichen Größe. Für weiteren Studien oder die Verwendung am Menschen wäre eine genaue Größenanpassung unabdingbar. Hierbei bietet das Tissue Engineering den großen Vorteil, dass man beliebig große Scaffolds anfertigen kann und so individuelle Klappen für jeden Patienten herstellen kann.

Aus organisatorischen Gründen war es leider nicht immer möglich, dass alle Tiere pünktlich zu ihrem Follow-up Kontrolltermin untersucht werden konnten. Spätestens zum nächsten Untersuchungstermin wurden die fehlenden Parameter dann aber bestimmt. Auch in der Anfertigung der histologischen Präparate gab es gelegentlich Probleme, so dass z.B. an manchen Schnitten

4. Diskussion

die Klappe nicht zu erkennen war, oder dass bei der verwendeten Dünnschliff-Technik zu viel Material abgetragen wurde und somit diese Klappen nur noch bedingt beurteilt werden konnten.

4.5 Ausblick für weitere Arbeiten

Die in dieser Studie gewonnenen Daten konnten zeigen, dass es möglich ist eine autologe, de-zellularisierte tissue-engineerten Herzklappenprothese herzustellen und diese minimalinvasive zu implantieren.

Die in den ersten beiden Generationen der Klappe aufgetretenen Probleme, wie die Beschädigungen der Taschen durch das Crimpen, konnten erfolgreich beseitigt werden. Die Stabilität der Klappe wurde durch die Verlängerung der Besiedlungsdauer im Bioreaktor erhöht und dadurch kam es zu keiner weiteren Beschädigung der Klappe mehr durch das Crimping. Eine Modifizierung des Ablagesystems, die einen Abbruch bzw. eine Korrektur der Ablage der Klappe ermöglicht wäre zu diskutieren. Um die Klappe möglichst genau implantieren zu können, wäre eine medikamentöse Verlangsamung der Herzfrequenz oder eine Erhöhung mittels Overpacing, für eine kurze Dauer während der Ablage, in Erwägung zu ziehen.

Die Funktion der Klappe war sehr gut, so zeigten sich in der intrakardialen Echokardiographie keine signifikanten Flussbeschleunigungen, auch die Druckverhältnisse änderten sich nicht relevant durch die neue Klappe. Die in der MRT bestimmte Regurgitationsfraktion lag im Median nach 52 Wochen Follow-up noch unterhalb von 15 %. Zwar war die Tendenz über das Follow-Up hinweg stets leicht ansteigend, der Wert von unter 15 % ist allerdings sehr zufriedenstellend. In einer weiteren Arbeit wäre die Verwendung eines bioresorbierbaren Stents zu überlegen, hiermit wäre die dTEHV nicht mehr mechanisch begrenzt und könnte hierdurch gegebenenfalls mitwachsen. Da es sich bei Pulmonalklappenerkrankungen hauptsächlich um Erkrankungen handelt, die bereits angeboren sind oder im Kindesalter auftreten, wäre es für eine Anschlussstudie interessant Lämmer, anstatt ausgewachsene Schafe zu untersuchen. Mit noch wachsenden Lämmern könnte sich das Wachstumsverhalten der Klappen beurteilen lassen. Sollte es zu solch einer Studie kommen, sollte die Klappe nicht wie in diesem Projekt eine einheitliche Größe erhalten, sondern sollte individuell auf das Lamm angepasst werden oder zumindest sollten mehrere Größen zur Verfügung stehen. Außerdem sollte noch eine Langzeitstudie über mehrere Jahre folgen, dieses Projekt war auf ein Jahr limitiert.

Da Schafe einen erhöhten Kalziumstoffwechsel besitzen und es bei zwei Tieren zu Verkalkung der Klappe kam, wäre ein alternatives Tiermodell oder eine klinische Studie am Menschen zu diskutieren. In den zwei dTEHV in den Kalk nachgewiesen werden konnte zeigte sich bis zum Ende der Untersuchung nach 52 Wochen eine gute Funktion der Klappe. Aufgrund des erhöhten

4. Diskussion

Kalziumstoffwechsels des Schafes ist davon auszugehen, dass diese beobachteten Verkalkungen in einem anderen Modell weniger ausgeprägt wären.

4.6 Schlussfolgerung

Diese Arbeit hat gezeigt, dass es möglich ist, eine autologe, dezellularisierten, tissue-engineerten Herzklappenprothesen herzustellen und mit der minimalinvasiven transvenösen Methode zu implantieren. Die Ergebnisse waren durchaus vielversprechend. Funktionell zeigten die Klappen nach dem Follow-up von 52 Wochen eine gute Funktion und keine Anzeichen für Stenosierung oder ausgeprägte Insuffizienzen. Die vor der Implantation dezellularisierte Herzklappe bildete auch auf histologischer Ebene alle wichtigen Bestandteile neu aus. Für eine anschließende Arbeit wäre über ein neues Tiermodell nachzudenken, um die Kalzifizierung der dTEHV erneut zu untersuchen. Genauso wäre die Verwendung eines bioresorbierbaren Stents zu überlegen, um die Klappe mechanisch nicht zu begrenzen und sie so ggf. am Wachstum zu hindern. Aufgrund der guten Ergebnisse wäre weitere Forschung auf diesem Gebiet sehr zu begrüßen, um das volle Potential des Tissue-Engineerings auszuschöpfen.

5. Literaturverzeichnis

1. Iaizzo P, Bianco RW, Hill AJ. Heart Valves [Internet]. Iaizzo PA, Bianco RW, Hill AJ, st. Louis JD, editors. Boston, MA: Springer US; 2013 [cited 2016 Jun 21]. 1–430 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-6144-9>
2. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2002 Jun [cited 2015 Feb 22];39(12):1890–900. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109702018867>
3. Stein PD, Alpert JS, Copeland J, Dalen JE, Goldman S, Turpie AGG. Antithrombotic therapy in patients with mechanical and biological prosthetic heart valves. *Chest*. 1992;102(4 SUPPL.):445S-455S.
4. McElhinney DB, Hennesen JT. The Melody® valve and Ensemble® delivery system for transcatheter pulmonary valve replacement. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2013 Jul [cited 2016 May 23];1291:77–85. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3910161&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Manji RA, Lee W, Cooper DKC. Xenograft bioprosthetic heart valves : Past , present and future. *International Journal of Surgery* [Internet]. 2015;23:280–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijso.2015.07.009>
6. Michael Schünke, Schulte E, Schumacher U. Prometheus - LernAtlas der Anatomie: Innere Organe. Thieme; Auflage: 4 (2. September 2015); 2015.
7. Aust G, Aumüller G, Kirsch J. Duale Reihe: Anatomie [Internet]. Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG, editors. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010 [cited 2016 Jun 21]. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-002-46981>
8. Moore K, Persaud TVN, Torchia MG. Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; Auflage: 6 (17. September 2013); 2013.
9. Combs MD, Yutzey KE. Heart valve development: regulatory networks in development and disease. *Circ Res* [Internet]. 2009 Aug 28 [cited 2016 Apr 26];105(5):408–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2777683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Rabkin-aikawa E, Jr. JEM, Schoen FJ. Heart Valve Regeneration. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2005;94:141–79.
11. Markwald RR, Fitzharris TP, Manasek FJ. Structural Development of Endocardial Cushions. *The American journal of anatomy*. 1977;148((1)):85–119.

5. Literaturverzeichnis

12. Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res* [Internet]. 2004 Sep 3 [cited 2016 Apr 28];95(5):459–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2810618&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Louis Gross, Kugel MA. Topographic Anatomy and Histology of the Vales in the Human Heart. *Am J Pathol*. 1931;7((5)):445–74.
14. Cooper T, Napolitano LM, Fitzgerald MJT. Structural Basis of Cardiac Valvar Function. *Archives of Surgery Journal*. 1966;Nev(93(5)):767.771.
15. Yacoub MH, Kilner PJ, Birks EJ, Misfeld M. The Aortic Outflow and Root : A Tale of Dynamism and Crosstalk. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:37–43.
16. Weibel ER, Plande GE. NEW CYTOPLASMIC COMPONENTS IN ARTERIAL ENDOTHELIA. *The Journal of Cell Biology* [Internet]. 1964 Oct 1 [cited 2016 Jun 23];23(1):101–12. Available from: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.23.1.101>
17. Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng* [Internet]. 2006 Dec [cited 2016 Jan 15];34(12):1799–819. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1705506&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2003;35:113–8.
19. Stock UA, Wiederschain D, Kilroy SM, Shum-tim D, Khalil PN, Vacanti JP, Jr JEM, Moses MA. Dynamics of Extracellular Matrix Production and Turnover in Tissue Engineered Cardiovascular Structures. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2001;228(2):220–8.
20. Filip DA, Radu A, Simionescu M. Interstitial cells of the heart valves possess characteristics similar to smooth muscle cells. *Circulation Research* [Internet]. 1986 Sep 1 [cited 2016 Jun 21];59(3):310–20. Available from: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.59.3.310>
21. Cole WG, Chan D, Hickey AJ, Wilcken DEL. Collagen composition of normal and myxomatous human mitral heart valves. *Biochemical Journal* [Internet]. 1984 Apr 15 [cited 2016 Jun 21];219(2):451–60. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj2190451>
22. Bashey RI, Ph D, Torii S, Angrist A. Age-Related Collagen and Elastin Content of Human Heart Valves. *The Journals of Gerontology*. 1956;Apr;22(2):203-208.
23. M. Scott, Vesely I. Aortic Valve of Elastin Cusp Microstructure : *The Annals of Thoracic Surgery*. 1995;60:391–4.

5. Literaturverzeichnis

24. Rothenburger M, Völker W, Ph D, Vischer P, Glasmacher B, Scheld HH, Deiwick M. Ultrastructure of Proteoglycans in Tissue-Engineered Cardiovascular Structures. *Tissue Engineering*. 2002;8(6):1049–56.
25. Murata K. Acidic glycosaminoglycans in human heart valves. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [Internet]. 1981 Mar [cited 2016 Jun 16];13(3):281–92. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022282881903163>
26. Misfeld M, Sievers HH. Heart valve macro- and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2007 Aug 29 [cited 2016 Mar 9];362(1484):1421–36. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2440405&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
27. Vesely I. The role of elastin in aortic valve mechanics. *J Biomech*. 1998;31(November 1997):115–23.
28. Pape HC, Klinke R, Brenner B. *Physiologie*. 7. Auflage. Thieme, editor. Stuttgart: Thieme; 2014. 1024 p.
29. McGeachie JK, Tennant M. REVIEW ARTICLE BLOOD VESSEL STRUCTURE AND FUNCTION : A BRIEF UPDATE ON RECENT ADVANCES. *ANZ Journal of Surgery*. 1990;10(June):747–53.
30. Welsch U. *Welsch - Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer Verlag München - Jena; 2003. 212–218 p.
31. Angelika Lindinger. Prävalenz angeborener Herzfehler bei Neugeborenen in Deutschland. *DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR PÄDIATRISCHE KARDIOLOGIE*. 2013;July:1–5.
32. Economic D of, Affairs and S, Division P. *World Populations Prospects* [Internet]. 2015. Available from: http://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf
33. Yacoub MH, Takkenberg JJM. Will heart valve tissue engineering change the world? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* [Internet]. 2005 Feb [cited 2016 May 29];2(2):60–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16265355>
34. Christen T, Lerch R, Trigo P. Die Aortenklappenstenose beim Erwachsenen. *Schweiz Med Forum*. 2006;6:626–32.
35. Uebing A, Eicken A, Horke A. Leitlinie Pädiatrische Kardiologie: Pulmonalinsuffizienz. *Leitlinie der Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie*. 2015;Sep:1–9.
36. Freeman SB, Taft LF, Dooley KJ, Allran K, Sherman SL, Hassold TJ, Khoury MJ, Saker DM. Population-Based Study of Congenital Heart Defects in Down Syndrome. *American Journal of Medical Genetics*. 1998;217(January):213–7.

5. Literaturverzeichnis

37. Bergström S, Carr H, Petersson G, Stephansson O, Bonamy AKE, Dahlström A, Halvorsen CP, Johansson S. Trends in Congenital Heart Defects in Infants With Down Syndrome. *Pediatrics* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2016 Jun 21];138(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27252035>
38. Jux C, Wei J, Pozza RD, Bennink G, L. Leitlinie Pädiatrische Kardiologie: Valvuläre Pulmonalstenose. Leitlinie der Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie. 2010;Aug:4–7.
39. Peterson C, Schilthuis JJ, Dodge-khatami A, Hitchcock JF, Meijboom EJ, Bennink GBWE. Comparative Long-Term Results of Surgery Versus Balloon Valvuloplasty for Pulmonary Valve Stenosis in Infants and Children. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2003;76:1078–83.
40. Holmes JC, Fowler NO, Kaplan S. Pulmonary valvular insufficiency. *The American Journal of Medicine* [Internet]. 1968 Jun [cited 2016 Jun 21];44(6):851–62. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002934368900855>
41. Ahmad Z, Alwi M. Cardiac Catheterization for Congenital Heart Disease [Internet]. Butera G, Chessa M, Eicken A, Thomson J, editors. Milano: Springer Milan; 2015 [cited 2016 May 19]. 279–297 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-88-470-5681-7>
42. Bertram H, Hofbeck M, Horke A. Pulmonalatresie mit intaktem Ventrikelseptum (PA-IVS). Leitlinie der Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie. 2015;Feb.:1–12.
43. Eicken A, Bertram H, Sachweh JS, Weil J. Pulmonalatresie mit Ventrikelseptumdefekt (PA-VSD). S2 Leitlinie der Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie. 2012;Dez:1–8.
44. Ewert P, Horke A, Haas N. Leitlinie Pädiatrische Kardiologie: Aortenklappenstenose. Leitlinie der Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie. 2011;Jun:1–7.
45. Breuer J, Uebing A, Schneider MB, Schäfers HJ. Aortenklappeninsuffizienz. Leitlinie der Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie Deutsche Gessellschaft für Pädiatrische Kardiologie. 2010;Dez:1–5.
46. Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, Flachskampf F, Hall R, Iung B, Kasprzak J, Nataf P, Tornos P, Torracca L, Wenink A. Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* [Internet]. 2007 Jan [cited 2016 Apr 21];28(2):230–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259184>
47. Nishimura R a, Otto CM, Bonow RO, Carabello B a, Erwin JP, Guyton R a, O’Gara PT, Ruiz CE, Skubas NJ, Sorajja P, Sundt TM, Thomas JD. 2014 AHA/ACC Guideline

5. Literaturverzeichnis

- for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2014 Jun 10 [cited 2014 Jul 13];63(22):e57–185. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24603191>
48. Geissler HJ, Schlensak C, Südkamp M, Beyersdorf F. Heart valve surgery today: indications, operative technique, and selected aspects of postoperative care in acquired valvular heart disease. *Dtsch Arztebl Int* [Internet]. 2009 Mar [cited 2016 May 23];106(13):224–33; quiz 234. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2683397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Hubbell G, Cheitlin MD, Rapaport E. Presentation, management, and follow-up evaluation of infective endocarditis in drug addicts. *American Heart Journal* [Internet]. 1981 Jul [cited 2016 Jun 16];102(1):85–94. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000287038190418X>
50. Beckmann A, Funkat AK, Lewandowski J, Frie M, Ernst M, Hekmat K, Schiller W, Gummert JF, Cremer JT. Cardiac Surgery in Germany during 2014: A Report on Behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2015 Jun [cited 2016 Apr 27];63(4):258–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26011675>
51. Driessen-Mol A, Emmert MY, Dijkman PE, Frese L, Sanders B, Weber B, Cesarovic N, Sidler M, Leenders J, Jenni R, Grünenfelder J, Falk V, Baaijens FPT, Hoerstrup SP. Transcatheter implantation of homologous “off-the-shelf” tissue-engineered heart valves with self-repair capacity: long-term functionality and rapid in vivo remodeling in sheep. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2014 Apr 8 [cited 2016 Mar 14];63(13):1320–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24361320>
52. Bloomfield P. Choice of heart valve prosthesis. *Heart* [Internet]. 2002 Jun 1 [cited 2016 Jun 21];87(6):583–9. Available from: <http://heart.bmj.com/cgi/doi/10.1136/heart.87.6.583>
53. Cannegieter SC, Rosendaal FR, Briet E. Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses. *Circulation* [Internet]. 1994 Feb 1 [cited 2016 Jun 21];89(2):635–41. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.89.2.635>
54. Cannegieter SC, Rosendaal FR, Wintzen AR, van der Meer FJ, Vandenbroucke JP, Briet E. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with mechanical heart valves. *N Engl J Med*. 1995 Jul;333(1):11–7.
55. Ross J, F.R.C.S. C. Homograft replacement of the aortic valve. *British Journal of Surgery*. 1967;54(10):842–5.
56. Heras M, Chesebro J, Fuster V, Penny W, Grill DE, Bailey KR, Danielson GK, Orszulak TA, Pluth JR, Puga FJ, Schaff H V, Larsonkeller JJ. High Risk of Thromboemboli

5. Literaturverzeichnis

- Early After Bioprosthetic Cardiac Valve Replacement. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25(5):1111–9.
57. Hoffmann G, Lutter G, Cremer J. Verbesserte Haltbarkeit von biologischen Herzklappen. *Dtsch Arztebl Int.* 2008 Feb;105(8):143–8.
58. Furnica C, Chistol RO, Constantin ML, Alexa AI, Tinca G. Calcification of Bioprosthetic Heart Valves Biochemical substrate and prevention. *Revista de Chimie.* 2015;66(10):1716–9.
59. Piper C, Körfer R, Horstkotte D. Prosthetic valve endocarditis. *Heart.* 2001;85:590–3.
60. Herold G. *Herold Innere Medizin 2016.* Herold, Gerd (1. Oktober 2015); 2016.
61. Harken DE, Taylor WJ, Lefemine AA. Aortic Valve Replacement with a Caged Ball Valve. *Am J Cardiol.* 1962;Feb:292–9.
62. Cheung DY, Duan B, Butcher JT. Current progress in tissue engineering of heart valves: multiscale problems, multiscale solutions. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 May 9];15(8):1155–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26027436>
63. Hufnagel C, Gomes M. Late follow-up of ball-valve prostheses in the descending thoracic aorta. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 1976;72((6)):900–9.
64. W. Vongpatanasin, Hillis D, Lange R. Characteristics of prosthetic valves. *The New England Journal of Medicine.* 1996;335(6):407–16.
65. Jones JM, O’kane H, Gladstone DJ, Sarsam M a, Campalani G, MacGowan SW, Cleland J, Cran GW. Repeat heart valve surgery: risk factors for operative mortality. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2001 Nov [cited 2016 May 23];122(5):913–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689796>
66. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A. Percutaneous Transcatheter Implantation of an Aortic Valve Prosthesis for Calcific Aortic Stenosis: First Human Case Description. *Circulation* [Internet]. 2002 Nov 25 [cited 2016 Apr 26];106(24):3006–8. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.0000047200.36165.B8>
67. Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Saliba Z, Merckx J, Aggoun Y, Bonnet D, Acar P, le Bidois J, Sidi D, Kachaner J. Percutaneous replacement of pulmonary valve in a right-ventricle to pulmonary-artery prosthetic conduit with valve dysfunction. *Lancet* [Internet]. 2000 Oct 21 [cited 2016 Jun 21];356(9239):1403–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11052583>
68. J. Nordmeyer. Akute und Ein-Jahres Ergebnisse nach perkutaner Pulmonalklappenimplantation (TPVI): vorläufige Ergebnisse des multizentrischen MELODY Registers. *Deutsche Gesellschaft für Kardiologie / German Cardiac Society.* 2014;8:1–3.

5. Literaturverzeichnis

69. Grünwald FA. Einfluss des Crimping auf Haltbarkeit und Gewebeintegrität bei eine experimentelle Analyse Inhalt. 2015.
70. Alavi SH, Groves EM, Kheradvar A. The effects of transcatheter valve crimping on pericardial leaflets. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2014 Apr [cited 2016 May 30];97(4):1260–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24444873>
71. Kiefer P, Gruenwald F, Kempfert J, Aupperle H, Seeburger J, Mohr FW, Walther T. Crimping May Affect the Durability of Transcatheter Valves : An Experimental Analysis. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2011;92(1):155–60.
72. Duerig TW, Wholey M, Duerig TW, Wholey M. A comparison of balloon- and self-expanding stents. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*. 2002 Jul;11(4):173–8.
73. Eggebrecht H, Schäfer U, Treede H, Boekstegers P, Babin-Ebell J, Ferrari M, Möllmann H, Baumgartner H, Carrel T, Kahlert P, Lange P, Walther T, Erbel R, Mehta RH, Thielmann M. Valve-in-valve transcatheter aortic valve implantation for degenerated bioprosthetic heart valves. *JACC Cardiovasc Interv* [Internet]. 2011 Nov [cited 2016 Jun 23];4(11):1218–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22115663>
74. Phan K, Zhao DF, Wang N, Huo YR, di Eusanio M, Yan TD. Transcatheter valve-in-valve implantation versus reoperative conventional aortic valve replacement: a systematic review. *J Thorac Dis* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 May 30];8(1):E83-93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4740128&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
75. Dijkman P, Driessen-Mol A, Heer LM de, Kluin J, Hoerstrup SP. Trans-apical versus surgical implantation of autologous ovine tissue-engineered heart valves. *The Journal of Heart Valve Disease*. 2012;21(5):670–8.
76. Walther T, Simon P, Dewey T, Wimmer-greinecker G, Falk V, Kasimir MT, Glogar D, Fehske W, Wolner E, Mohr FW, Mack M. Surgery for Valvular Heart Disease Multi-center Experience. *Circulation*. 2007;116(11):240–5.
77. Zeniou V, Chen S, Shuvy M, Luria D, Lotan C, Danenberg HD. The Use of Adenosine to Enable Safe Implantation of Transcatheter Tricuspid Valve. *Case Reports in Cardiology* [Internet]. 2017;2017:1–3. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/cric/2017/2760580/>
78. Webb JG, Pasupati S, Achtem L, Thompson CR. Rapid pacing to facilitate transcatheter prosthetic heart valve implantation. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* [Internet]. 2006 Aug;68(2):199–204. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ccd.20829>

5. Literaturverzeichnis

79. Cao Y, Vacanti J, Paige K, Upton J. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(No. 2):297–302.
80. Kasper C. Ersatzteillager Mensch? *Tissue Engineering. Chemie in unserer Zeit* [Internet]. 2005 Dec [cited 2016 May 26];39(6):394–401. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ciuz.200500347>
81. Shinoka T, Zund G, Miura T, Ma PX, Langer R, Vacanti JI, Mayer JE. Heart Valves : Valve in a Lamb Model Leaflet. *The Annals of Thoracic Surgery.* 1995;4975(95):4–7.
82. Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ, Mayer JE. Functional Living Trileaflet Heart Valves Grown In Vitro. *Circulation* [Internet]. 2000 Nov 7 [cited 2016 May 31];102(Supplement 3):44–9. Available from: http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.102.suppl_3.III-44
83. Schnell AM, Hoerstrup SP, Zund G, Kolb S, Sodian R, Visjager JF, Grunenfelder J, Suter A, Turina M. Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts. *Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2001 Aug [cited 2016 Jun 16];49(4):221–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11505318>
84. Simper D, Stalboerger P, Panetta CJ. Smooth Muscle Progenitor Cells in Human Blood. *Circulation* [Internet]. 2002 Aug 19 [cited 2016 May 30];106(10):1199–204. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.0000031525.61826.A8>
85. Mol A, Driessen NJB, Rutten MCM, Hoerstrup SP, Bouten CVC, Baaijens FPT. Tissue engineering of human heart valve leaflets: a novel bioreactor for a strain-based conditioning approach. *Ann Biomed Eng* [Internet]. 2005 Dec [cited 2016 Apr 8];33(12):1778–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16389526>
86. Nerem RM, Seliktar D. *Vascular Tissue Engineering. Annual Review of Biomedical Engineering.* 2001;3:225–43.
87. van Vlimmeren MAA, Driessen-Mol A, Oomens CeesWJ, Baaijens FPT. Passive and active contributions to generated force and retraction in heart valve tissue engineering. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology.* 2012;11:1015–27.
88. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* [Internet]. 2011 Apr [cited 2015 Jun 20];32(12):3233–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3084613&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
89. Cebotari S, Tudorache I, Ciubotaru A, Boethig D, Sarikouch S, Goerler A, Lichtenberg A, Cheptanaru E, Barnaciuc S, Cazacu A, Maliga O, Repin O, Maniuc L, Breyman T, Haverich A. Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement

5. Literaturverzeichnis

- may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. *Circulation* [Internet]. 2011 Sep 13 [cited 2016 Apr 8];124(11 Suppl):S115-23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21911800>
90. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT™ in pediatric patients. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* [Internet]. 2003 Jun [cited 2016 Apr 8];23(6):1002–6. Available from: [http://ejcts.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S1010-7940\(03\)00094-0](http://ejcts.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S1010-7940(03)00094-0)
91. Voges I, Bräsen JH, Entenmann A, Scheid M, Scheewe J, Fischer G, Hart C, Andrade A, Pham HM, Kramer HH, Rickers C. Adverse results of a decellularized tissue-engineered pulmonary valve in humans assessed with magnetic resonance imaging. *Eur J Cardiothorac Surg* [Internet]. 2013 Oct [cited 2016 Jun 8];44(4):e272-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23818571>
92. Perri G, Polito A, Esposito C, Albanese SB, Francalanci P, Pongiglione G, Carotti A. Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction in patients with congenital heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg* [Internet]. 2012 Jun [cited 2016 May 4];41(6):1320–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22219487>
93. Cicha I, Ruffer A, Cesnjevar R, Glöckler M, Agaimy A, Daniel WG, Garlich CD, Dittich S. Early obstruction of decellularized xenogenic valves in pediatric patients: involvement of inflammatory and fibroproliferative processes. *Cardiovasc Pathol* [Internet]. 2011 [cited 2016 Jun 8];20(4):222–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20598910>
94. Parvin Nejad S, Blaser MC, Santerre JP, Caldarone C a, Simmons C a. Biomechanical conditioning of tissue engineered heart valves: Too much of a good thing? *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016 Jan 15 [cited 2016 Jan 8];96:161–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26555371>
95. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Suprunov M, Tudorache G, Goerler H, Park J keun, Hilfiker-kleiner D, Ringes-lichtenberg S, Karck M, Brandes G, Hilfiker A, Haverich A. Preclinical Testing of Tissue-Engineered Heart Valves Re-Endothelialized Under Simulated Physiological Conditions. *Circulation*. 2006;114(1):559–65.
96. Spriestersbach H, Prudlo A, Bartosch M, Sanders B, Baaijens FPT, Hoerstrup P. First percutaneous implantation of a completely tissue-engineered self-expanding pulmonary heart valve prosthesis using a newly developed delivery system: a feasibility study in sheep. *Cardiovascular Intervention and Therapeutics*. 2016;31(2).
97. Bianco RW, Gallegos RP, Rivard AL, Voight J, Dalmaso AP. Animal Models for Cardiac Research. In: Iaizzo PA, editor. *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [cited 2016 Mar 14]. p. 393–410. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-372-5>

5. Literaturverzeichnis

98. Ali ML, Bjornstad K, Duran CMG, Cardiovascular S. The sheep as an animal model for heartvalve research. *Cardiovascular Surgery*. 1996;4(95):543–9.
99. Barnhart G, Jones M, Ishihara T, Chavez AM. Bioprosthetic valvular failure. Clinical and pathological observations in an experimental animal model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1982;April(1):618–31.
100. Sands MP, Rittenhouse E a., Mohri H, Merendino KA. An Anatomical Comparison of Human, Pig, Calf, and Sheep Aortic Valves. *The Annals of Thoracic Surgery* [Internet]. 1969 Nov [cited 2016 May 30];8(5):407–14. Available from: <http://linking-hub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003497510660717>
101. Grehan J, Hilbert S, Ferrans V. Development and evaluation of a swine model to assess the preclinical safety of mechanical heart valves. *The Journal of Heart Valve Disease*. 2000;9(1):719–20.
102. Flameng W, Meuris B, Yperman J, de Visscher G, Herijgers P, Verbeken E. Factors influencing calcification of cardiac bioprostheses in adolescent sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2006 Jul [cited 2016 Feb 15];132(1):89–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16798307>
103. Vesely I. Heart valve tissue engineering. *Circ Res*. 2005 Oct;97(8):743–55.
104. Bartel T. Intrakardiale Echokardiographie und “intraluminal phased-array imaging” zur Führung interventioneller Prozeduren. *Journal für Kardiologie*. 2008;15((7-8)):211–7.
105. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, Iung B, Otto CM, Pellikka P a, Quiñones M. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *Eur J Echocardiogr* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Apr 14];10(1):1–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19065003>
106. Bartosch M, Peters H, Darach O, Berger F, Schmitt B. A Universal Delivery System for Percutaneous Heart Valve Implantation. *Annals of Biomedical Engineering*. 2016;44(9):2683–94.
107. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues *. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 1982;Aug;11((4)):318–26.
108. Zoghbi W a, Chambers JB, Dumesnil JG, Foster E, Gottdiener JS, Grayburn P a, Khandheria BK, Levine R a, Marx GR, Miller F a, Nakatani S, Quiñones M a, Rakowski H, Rodriguez LL, Swaminathan M, Waggoner AD, Weissman NJ, Zabalgoitia M. Recommendations for evaluation of prosthetic valves with echocardiography and doppler ultrasound. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2009 Sep;22(9):975–1014.

5. Literaturverzeichnis

109. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Suprunov M, Tudorache G, Goerler H, Park J keun, Hilfiker-kleiner D, Ringes-lichtenberg S, Karck M, Brandes G, Hilfiker A, Ha-verich A. Preclinical Testing of Tissue-Engineered Heart Valves Re-Endothelialized Under Simulated Physiological Conditions. *Circulation*. 2006;114(1):559–65.
110. Kiefer P, Gruenwald F, Kempfert J, Aupperle H, Seeburger J, Mohr FW, Walther T. Crimping May Affect the Durability of Transcatheter Valves : An Experimental Analysis. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2011;92(1):155–60.
111. Spriestersbach H, Prudlo A, Bartosch M, Sanders B, Baaijens FPT, Hoerstrup P. First percutaneous implantation of a completely tissue-engineered self-expanding pulmonary heart valve prosthesis using a newly developed delivery system: a feasibility study in sheep. *Cardiovascular Intervention and Therapeutics*. 2016;31(2).
112. Walther T, Simon P, Dewey T, Wimmer-greinecker G, Falk V, Kasimir MT, Glogar D, Fehske W, Wolner E, Mohr FW, Mack M. Surgery for Valvular Heart Disease Multi-center Experience. *Circulation*. 2007;116(11):240–5.
113. Bartosch M, Peters H, Darach O, Berger F, Schmitt B. A Universal Delivery System for Percutaneous Heart Valve Implantation. *Annals of Biomedical Engineering*. 2016;44(9):2683–94.
114. Duerig TW, Wholey M, Duerig TW, Wholey M. A comparison of balloon- and self-expanding stents. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*. 2002 Jul;11(4):173–8.
115. Cannegieter SC, Rosendaal FR, Wintzen AR, van der Meer FJ, Vandenbroucke JP, Briët E. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with mechanical heart valves. *N Engl J Med*. 1995 Jul;333(1):11–7.
116. Stock UA, Wiederschain D, Kilroy SM, Shum-tim D, Khalil PN, Vacanti JP, Jr JEM, Moses MA. Dynamics of Extracellular Matrix Production and Turnover in Tissue Engineered Cardiovascular Structures. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2001;228(2):220–8.
117. Piper C, Körfer R, Horstkotte D. Prosthetic valve endocarditis. *Heart*. 2001;85:590–3.
118. Vesely I. Heart valve tissue engineering. *Circ Res*. 2005 Oct;97(8):743–55.

6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Valentin Stegner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Histologie der dezellularisierten, tissue-engineerten, minimalinvasiv trans-venös implantierten Pulmonalklappen im Schafsmodell. / Histology of the decellularized, tissue-engineered, minimally invasive transvenously implanted pulmonary valves in a sheep model. selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum: 03.11.2022

Unterschrift: Valentin Stegner

7. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Felix Berger und meinem Betreuer PD Dr. Boris Schmitt, für die Überlassung dieses interessanten und spannenden Themas und die großartige Unterstützung, bedanken. Ich habe mich ab dem ersten Tag sehr wohl und nie allein gelassen gefühlt. Die Zeit, in der ich diese Arbeit verfasst habe, hat mir verdeutlicht, dass ich mit der Pädiatrie und der Kinderkardiologie ein Fach für mich gefunden habe.

Als nächstes möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Life Valve bedanken. Es wurde nie langweilig im Büro und immer hatte jemand ein offenes Ohr für Fragen. Ein besonderes Dankeschön an Leon Bruder, der sich viel Zeit genommen hat und mir sehr viel erklärt und gezeigt hat. Vielen Dank auch an Marco Bartosch.

Einen großen Dank an Prof. Matthias Sigler, für die interessante und aufschlussreiche Hospitation in Göttingen. Hierbei habe ich sehr viel gelernt, gerade in Hinsicht der Histologie der Klappen.

Vielen Dank an meine Eltern, Dr. Andreas Stegner und Christine Schüler-Stegner, sowie meine Oma Erika Stegner für die moralische und finanzielle Unterstützung über das ganze Studium hinweg.

9. Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietschke

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
frank.konietschke@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Stegner, Valentin
Emailadresse: valentin.stegner@charite.de
Matrikelnummer: 149502
PromotionsbetreuerIn: PD Dr. Boris Schmidt
Promotionsinstitution: DHZB

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herrn *Valentin Stegner* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 30.09.2022

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Bei der Auswertung handelt es sich um eine rein deskriptive Auswertung
- Die Darstellung der deskriptiven Statistiken in den Tabellen sollte präzisiert werden

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 11.10.2022

Name des Beraters: Lukas Mödl

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

