

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

DISSERTATION

**In vivo Evaluation und Histologie minimalinvasiv implantierter tissue-
engineerter Pulmonalklappen im Schafsmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Torben Radtke

aus Flensburg

Datum der Promotion: 22.09.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Zusammenfassung der Arbeit.....	7
Abstract.....	9
1. Einleitung.....	10
1.1. Allgemeines.....	10
1.2. Anatomie der Pulmonalklappe.....	10
1.2.1. Makroskopischer Aufbau.....	10
1.2.2. Mikroskopischer Aufbau.....	11
1.3. Pulmonalklappenersatz.....	12
1.4. Implantationsverfahren: chirurgisch vs. minimalinvasiv.....	14
1.5. Tissue-Engineering.....	16
1.5.1. Allgemeine Übersicht zum Tissue-Engineering.....	16
1.5.2. Dezellularisierte Homo- und Xenografts.....	17
1.5.3. „Klassisch“ tissue-engineerte Herzklappen.....	18
1.5.4. Minimalinvasive Implantation tissue-engineerter Herzklappen.....	19
1.6. Das Schaf als Tiermodell.....	20
1.7. Fragestellung und Hypothesen.....	20
2. Methoden.....	22
2.1. Tiere.....	22
2.2. Ablagesystem.....	23
2.3. Klappen.....	26
2.3.1. Scaffold.....	26
2.3.2. Zellgewinnung.....	26
2.3.3. Klappenproduktion.....	27
2.3.4. Dezellularisierung.....	27
2.4. Stents.....	28
2.5. Crimping.....	28
2.6. Versuchsablauf.....	29
2.6.1. Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen.....	29
2.6.2. Anästhesie und Monitoring.....	30
2.6.3. Lagerung bei den Eingriffen.....	32

2.6.4.	Computertomographie	32
2.6.5.	Implantationsprozedur.....	32
2.6.6.	Intrakardiale Echokardiographie (ICE)	33
2.6.7.	Angiographie.....	34
2.6.8.	Invasive Druckmessung	34
2.6.9.	Explantation	34
2.7.	Makroskopische Untersuchung	35
2.8.	Histologie	35
2.9.	Statistische Auswertung	37
3.	Ergebnisse	39
3.1.	Charakteristika der Tiere vor Implantation.....	39
3.2.	Verwendete Materialien und Crimping	40
3.3.	Erfolg und Komplikationen bei der Implantation	41
3.4.	Funktion der Klappen direkt nach der Implantation	44
3.4.1.	Ausschluss von Tieren von der Analyse	44
3.4.2.	Intrakardiale Echokardiographie.....	45
3.4.3.	Invasive Druckmessung	47
3.5.	Follow-up.....	47
3.5.1.	Einhaltung der Follow-up-Zeitpunkte.....	47
3.5.2.	CT-Untersuchungen.....	48
3.5.3.	Entwicklung der Klappenfunktion	49
3.5.3.1.	Intrakardiale Echokardiographie (Insuffizienz)	49
3.5.3.2.	Echokardiografische Druckmessungen.....	51
3.5.3.3.	Invasive Druckmessung	51
3.6.	Makroskopische Analyse.....	52
3.7.	Histologie	56
3.7.1.	Endothelialisierung.....	56
3.7.2.	Zellen im Gewebe	57
3.7.3.	Matrixkonfiguration.....	59
3.7.4.	Weitere Aspekte und besondere Auffälligkeiten.....	60
4.	Diskussion	64
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	65
4.2.	Vergleich mit anderen Studien	66
4.2.1.	Die minimalinvasive Implantation	66

4.2.2.	Funktion der tissue-engineerten Klappe.....	69
4.2.3.	Stenosierung.....	74
4.2.4.	Makroskopische Analyse	75
4.2.5.	Histologie	76
4.3.	Limitationen dieser Studie	79
4.4.	Ausblick für weitere Studien	80
4.5.	Schlussfolgerung.....	81
5.	Literaturverzeichnis	83
6.	Eidesstattliche Versicherung	94
7.	Anteilerklärung.....	95
8.	Lebenslauf.....	97
9.	Publikationsliste.....	99
10.	Danksagung	101

Abkürzungsverzeichnis

CT = Computertomographie

dTE-Klappe = dezellularisierte tissue-engineerte Klappe

EKG = Elektrokardiografie

evtl. = eventuell

EZM = extrazelluläre Matrix

FEM = Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin

Fr = French (medizinisches Maß für den Außendurchmesser von Kanülen und Kathetern) = 1/3 mm

h = Stunden

ICE = intrakardiale Echokardiographie

IE = internationale Einheiten

i.m. = intramuskulär

i.v. = intravenös

kg = Kilogramm

KG = Körpergewicht

mM = Millimol

mmHg = Torr (Millimeter-Quecksilbersäule)

ms = Millisekunden

m/s = Meter pro Sekunde

n = Anzahl

O₂ = Sauerstoff

OP = Operation

PBS = phosphatgepufferte Salzlösung (von englisch „phosphat buffered saline“)

RVOT = rechtsventrikulärer Ausflusstrakt (von englisch „right ventricular outflow tract“)

SD = Standardabweichung

s.o. = siehe oben

sog. = sogenannt

s.u. = siehe unten

µm = Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der natürlichen Pulmonalklappe.	11
Abbildung 2: Gruppeneinteilung der Studientiere	23
Abbildung 3: Ablagesystem	24
Abbildung 4: Selbstexpandierbarer Nitinolstent mit eingenähtem Klappenkonduit ...	28
Abbildung 5: Crimping	29
Abbildung 6: Schematische Übersicht zum zeitlichen Versuchsablauf	30
Abbildung 7: Zusammenhang zwischen der Widerristhöhe und dem diastolischen Durchmesser der Pulmonalklappe.....	40
Abbildung 8 : Aussehen der Klappe vor Implantation	41
Abbildung 9: Ablauf der Implantation.....	42
Abbildung 10: Beladungsvorgang der Kapsel mit dem Klappenstent und vollständig beladene Kapsel.....	44
Abbildung 11: Insuffizienzgrad der Klappen unmittelbar nach Implantation.	45
Abbildung 12: Zusammenhang zwischen der Ovalität des Stents und dem Insuffizienzgrad der Klappe nach Implantation	48
Abbildung 13: Insuffizienzgrad der Klappen im Verlauf.	50
Abbildung 14: Insuffizienz der Klappen nach der Vena contracta Methode im Verlauf.	50
Abbildung 15: Invasiv gemessener systolischer Druckgradient im Verlauf.....	52
Abbildung 16: Makroskopische Ansicht des Herzens (Tier 21D1) bei Explantation..	53
Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Makroskopie von Klappen der Tiere der unterschiedlichen Follow-Up Gruppen.....	55
Abbildung 18: Darstellung der Verwachsung von Segel und Konduitwand	56
Abbildung 19: Endothelialisierung der Klappen	57
Abbildung 20: Re-Besiedelung der dTE-Klappe	58
Abbildung 21: Entwicklung der extrazellulären Matrix	60
Abbildung 22: Besonderheiten und histologische Auffälligkeiten.....	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen.....	37
Tabelle 2: Färbecharakteristika der Movat Pentachrom Färbung	37
Tabelle 3: CT-Messungen der nativen Durchmesser. Durchmesser an verschiedenen anatomischen Positionen des rechten Herzens und der Pulmonalstrombahn der Versuchstiere in der Diastole.....	39
Tabelle 4: Übersicht zu Insuffizienzgrad und besonderen Anmerkungen zu den einzelnen Tieren	46
Tabelle 5: Vergleich der echokardiografisch bestimmten Stenoseparameter vor und nach der Implantation.	47
Tabelle 6: Zeitpunkte der Untersuchungen mittels intrakardialer Echokardiographie	47
Tabelle 7: CT-Messungen zur Entwicklung des mittleren Stentdurchmessers	49
Tabelle 8: Echokardiografisch bestimmte Stenoseparameter im Verlauf	51
Tabelle 9: Übersicht makroskopischer Ergebnisse	54
Tabelle 10: Endothelialisierung und thrombotische Eigenschaften der Klappe.	63

Zusammenfassung der Arbeit

Hintergrund: Moderne Herzklappenprothesen sind noch immer unvollkommen. Biologische Klappen sind durch die frühzeitige Degeneration, mechanische durch die Notwendigkeit einer Antikoagulation limitiert. Beiden fehlt zudem die Fähigkeit sich zu regenerieren und zu wachsen. Gerade für pädiatrische Patienten macht dies oft wiederholte Operationen erforderlich. Tissue-engineerte Klappen bieten möglicherweise das Potential diese Limitationen zu überwinden.

Seit einigen Jahren befinden sich minimalinvasiv implantierbare Pulmonalklappen in der klinischen Anwendung. Diese Studie hatte das Ziel die Vorteile einer tissue-engineerten Herzklappe mit denen der minimalinvasiven transkutanen Implantation zu vereinen.

Methoden: Tissue-engineerte Herzklappen wurden auf Basis eines bioresorbierbaren Scaffolds und vaskulärer Myofibroblasten in einem Bioreaktor gezüchtet und nachfolgend dezellularisiert. Vernäht in einem selbstexpandierbaren Nitinolstent wurden sie bei 15 adulten Schafen über einen transkutanen Zugang in der Vena jugularis in Pulmonalklappenposition implantiert. Die Tiere wurden nachfolgend in 5er Gruppen für 8, 16 und 24 Wochen nachbeobachtet. Die Funktion und Morphologie der Klappen wurde mittels Angiographie, intrakardialer Echokardiographie und CT beurteilt. Nach Explantation wurden die Klappen makroskopisch und histologisch untersucht.

Ergebnisse: Die transkutane Implantation der Klappen war in allen Tieren erfolgreich. Das Follow-up konnte bei allen komplettiert werden. Nach Implantation zeigten die Klappen eine milde bis moderate Insuffizienz, welche im Follow-up bis zu einer moderaten oder schweren Insuffizienz zunahm. Es fanden sich keine Anzeichen einer Stenosierung durch das Klappenkonduit. Histologisch waren eine gute Wiederbesiedelung der Klappen mit Zellen und ein Umbau der extrazellulären Matrix sowie eine bereits nach 16 Wochen Follow-up durchgängige Endothelialisierung zu beobachten.

Diskussion: Wir konnten zeigen, dass die transkutane Implantation einer dezellularisierten tissue-engineerten Klappe in Pulmonalklappenposition durchführbar ist. Die in vivo Wiederbesiedelung der Matrix mit Zellen lässt ein Wachstum möglich erscheinen. Gründe für die Insuffizienz waren ein durch den nativen Ausflusstrakt oval verformter Stent, eine Verkürzung der Segel sowie eine

Verwachsung der Segel mit der Konduitwand. Wenn eine Beseitigung dieser funktionellen Probleme durch eine Verbesserung des Designs gelingt, stellen tissue-engineerte Herzklappen eine zukünftige Alternative zu den bisher verwendeten Klappenprothesen dar.

Abstract

Background: Modern heart valve prostheses are still imperfect. Biological prostheses suffer from early degradation whereas mechanical ones are limited by the need for anticoagulation. None of them has the ability to regenerate or grow. In children this often necessitates multiple re-operations for heart valve replacement during growth. Tissue-engineered heart valves might have the potential to overcome these limitations.

Minimally invasively implantable pulmonary valves were recently implemented in clinical use. The aim of this study was to combine the advantages of tissue-engineered heart valves with the minimally invasive implantation technique.

Methods: Tissue-engineered heart valves were cultivated in vitro using biodegradable scaffolds and vascular myofibroblasts, decellularised, sewn into self-expandable nitinol-stents and implanted transcutaneously in pulmonary position in 15 adult sheep. Follow-up was conducted at 8, 16 or 24 weeks (5 animals per group). Valve function and morphology were investigated in vivo by angiography, intracardiac echocardiography and CT-scans. After explantation valves were analyzed macroscopically and histologically.

Results: Transcutaneous implantation was successful in all animals and each completed its pre-planned follow-up. Immediately after implantation valves showed mild to moderate insufficiency that increased to moderate to severe insufficiency until the end of follow-up. There were no signs of stenosis at any time. Histology showed cells infiltrating the extracellular matrix and remodeling its components. The valves were completely endothelialised at 16 weeks.

Discussion: The study shows that production of a tissue-engineered heart valve and implantation through a transcutaneous approach are feasible. In vivo colonization and remodeling of the matrix with autologous cells indicates that growth seems possible. Reasons for insufficiency were the oval shape of the right ventricular outflow tract, shortening of the leaflets, and fusion of the leaflets with the conduit wall. If these functional problems are overcome, tissue-engineered valves may be an alternative to currently used heart valve prostheses.

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Herzklappen sind ein essentieller Bestandteil des menschlichen Blutkreislaufes, da nur durch sie ein gerichteter Blutfluss ermöglicht wird. Es existieren dabei zwei verschiedene Typen von Herzklappen: Die sogenannten Segelklappen (Mitral- und Trikuspidalklappe), welche die Vorhöfe von den Herzkammern trennen, und die Taschenklappen (Pulmonal- und Aortenklappe), welche die Herzkammern und die nachfolgenden Ausstrombahnen (Pulmonalarterie und Aorta) voneinander trennen.

Seit Anfang der 1960er Jahre besteht die Möglichkeit, eine erkrankte Herzklappe vollständig zu ersetzen. In diesen Jahren wurde etwa zeitgleich die erstmalige Verwendung mechanischer Klappen [1,2], damals noch sogenannter Kugelkäfigprothesen, und biologischer Homografts¹ [3,4] im Menschen erprobt. Bis dato wird ein Herzklappenersatz unter der Verwendung von mechanischen oder biologischen Herzklappen durchgeführt, welche noch immer zahlreiche Probleme mit sich bringen.

Gerade für Kinder mit angeborenen Herzfehlern ist die Versorgungssituation nur unzureichend, da keine der bisher kommerziell verfügbaren Klappenprothesen sich mit dem Wachstum der Kinder anpasst.

Tissue-engineerte Herzklappen bieten möglicherweise einen Weg diese Limitationen zu überwinden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Erprobung einer solchen tissue-engineerten Herzklappe, welche im Schafsmodell minimalinvasiv in Pulmonalklappenposition implantiert wurde.

1.2. Anatomie der Pulmonalklappe

1.2.1. Makroskopischer Aufbau

Die Pulmonalklappe verhindert den diastolischen Rückstrom von Blut aus der Pulmonalarterie in den rechten Ventrikel. Die Klappe besteht aus drei Taschen² (Valvula semilunaris dextra, sinistra und anterior) und befindet sich zwischen dem Infundibulum des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (RVOT) und dem Truncus

¹ Homograft = Von einem Menschen stammende Transplantate (Synonym: Allograft)

² Im Folgenden wird die frei bewegliche Fläche der Taschen als „Segel“ bezeichnet

pulmonalis der Pulmonalarterie. Ihre Segel sind halbmondförmig mit der Wand verwachsen, so dass ihre Fasern sowohl der infundibulären Muskulatur, als auch der pulmonalarteriellen Wand entspringen [5].

Die Segel der Klappe laufen an der pulmonalarteriellen Wand an den sogenannten Kommissuren zusammen. Der freie Raum zwischen den Segeln und der etwas ausgebuchteten Form des Bulbus der Pulmonalarterie, welcher sich in der Diastole mit Blut füllt, nennt sich Sinus.

Die sogenannte „hinge-region“ stellt die Verbindung der Segelunterkante mit der Wand dar. Entlang der Oberkante der Klappensegel verläuft die Lunula, eine etwas verdickte Wulst. Etwa in mittlerer Position der Lunula eines jeden Segels findet sich ein Knötchen, der sog. Nodulus. Sowohl Lunulae als auch die Noduli tragen zu einem suffizienten Schluss der Klappe in der Diastole bei (Abbildung 1).

Die Zone, in welcher die einzelnen Klappensegel sich in der Mitte treffen und über ein gewisses Stück aneinander liegen, nennt sich Koaptationszone [6,7].

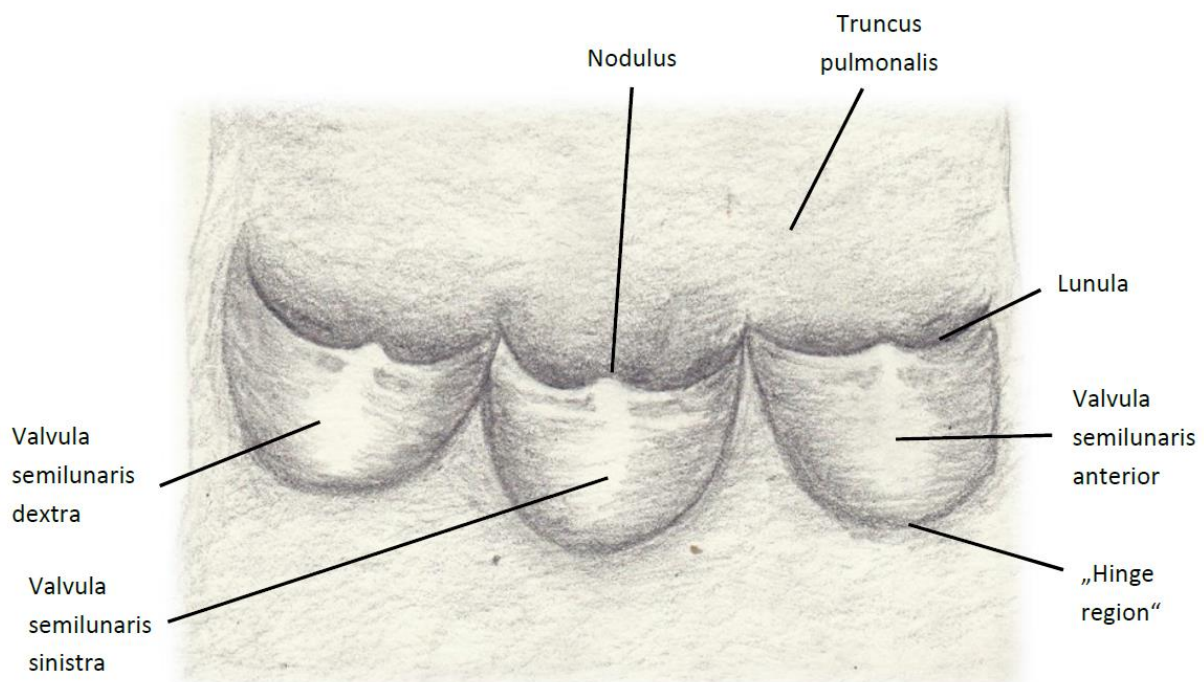


Abbildung 1: Anatomie der natürlichen Pulmonalklappe. Die Klappe ist zwischen Valvula semilunaris anterior und – dextra aufgeschnitten und ausgebreitet dargestellt.

1.2.2. Mikroskopischer Aufbau

Die Oberfläche der Klappen wird durch Endothelzellen gebildet, welche durch eine Basallamina von den darunterliegenden Schichten abgetrennt sind. Die

Endothelzellen bieten einen Schutz gegen die Anlagerung thrombotischen Materials sowie gegen eine Kalzifizierung der Klappenmatrix.

Unterhalb der Basallamina findet sich ein dreidimensional angeordnetes Netzwerk extrazellulärer Matrix. Dieses besteht im Wesentlichen aus Kollagen- und Elastinfasern sowie Proteoglykanen. Die Kollagenfasern bewirken eine gute Spannungsfestigkeit der Klappe, welche vor allem durch die starke Druckbelastung in der Diastole von Bedeutung ist. Kollagenfasern sind nur minimal dehnbar und daher in einer leichten Wellenform angeordnet um kleinere Verformungen bei Zug zu ermöglichen. Durch die elastischen Fasern der Klappenmatrix wird eine gute Flexibilität ermöglicht. Die zwischen den makromolekularen Fasern gelagerten Proteoglykane bilden durch ihre hohe wasserbindende Kapazität eine gelartige Grundsubstanz.

Durch die unterschiedliche Verteilung dieser Fasern lässt sich ein dreischichtiger Aufbau der Klappenmatrix beschreiben: Pulmonalarterienseitig liegt die kollagenreiche Fibrosa. Sie ist die kräftigste der drei Schichten. Nachfolgend schließt sich die vorwiegend aus Proteoglykanen und locker verteilten Kollagenfasern bestehende Spongiosa an. Sie ist nur locker mit den beiden äußeren Schichten verbunden und wirkt damit als Verschiebeschicht während des Herzzyklus. Ventrikelseitig gelegen befindet sich die an Elastin reiche Ventrikularis. Diese ist besonders dehnbar.

In allen drei Schichten, aber vor allem in der Spongiosa, liegen zwischen den Fasern verteilt zahlreiche Fibroblasten, die sog. valvulären Bindegewebszellen. Diese Zellen sind untereinander durch lange zelluläre Fortsätze verbunden. Das Zellnetzwerk ist mit den Komponenten der extrazellulären Matrix assoziiert und stellt so ein intrinsisches Umbau- und Reparatursystem dar. Durch Matrixsynthese ermöglichen die Zellen eine Anpassung der Klappe an die hämodynamischen Bedingungen [7-10].

1.3. Pulmonalklappenersatz

Der Pulmonalklappenersatz ist der am häufigsten durchgeführte Klappenersatz im Kreis der kongenital klappenerkrankten pädiatrischen Patienten [11]. Kongenitale Fehlbildungen wie ein Truncus arteriosus communis, eine isolierte valvuläre Stenose,

die Pulmonalatresie oder aber eine Fallot-Tetralogie erfordern nicht selten einen Ersatz der kompletten Pulmonalklappe [12].

Defekte an der Pulmonalklappe wirken sich in der Folge stark auf den rechten Ventrikel aus. Ein rechter Ventrikel, welcher durch eine insuffiziente Pulmonalklappe einem großen Pendel-Volumen ausgesetzt ist, neigt zur Dilatation [13]. Diese Dilatation kann neben einer verringerten Pumpleistung die Entwicklung von Herzrhythmusstörungen oder sogar einen plötzlichen Herztodes hervorrufen [13,14]. Ein Ersatz der Pulmonalklappe erscheint daher in den meisten Fällen sinnvoll und kann, je nach Zeitpunkt des Eingriffs, zur Normalisierung oder zumindest zur Verbesserung der rechtsventrikulären Funktion sowie des rechtsventrikulären Volumens beitragen [15,16].

Es existieren zahlreiche unterschiedliche Klappenprothesen und Implantationsverfahren für den Pulmonalklappenersatz [17-20]. Man unterscheidet im Wesentlichen biologische und mechanische Klappenprothesen.

Mechanische Herzklappen weisen eine gute Lebensdauer auf, erfordern aber auf Grund der thrombogenen Eigenschaft ihrer Oberfläche eine lebenslange antikoagulatorische Behandlung [21,22]. Diese Klappen sind damit nur für ausgewählte Patienten tauglich. So z.B. für Patienten, die aus anderen Gründen ständig antikoaguliert werden oder das Risiko von weiteren Re-Operationen nicht tragen könnten. Ebenso für solche, die ein sehr gut eingespieltes Sozial-/Familiensystem haben, welches ihnen hilft die Therapie zu überwachen, und diejenigen, die auf Grund ihrer noch sehr hohen Lebenserwartung ein Implantat mit dazu kongruenter Durabilität benötigen. Im Zuge des Klappenersatzes mit mechanischen Prothesen reduziert die antikoagulatorische Therapie das Risiko für thrombembolische Komplikationen deutlich, kann es aber nicht vollends ausschließen. Gleichzeitig bringen die Medikamente ein deutlich erhöhtes Blutungsrisiko mit sich [23].

Biologische Herzklappen existieren in großer Diversität. Unterschieden werden Homografts und Xenografts³. Zur Herstellung der Klappen werden spezielle physikalische und chemische Methoden, wie z.B. die Fixierung mit Glutaraldehyd, verwendet. Sowohl Homo- als auch Xenografts sind weit weniger thrombogen als

³ Xenograft = Von einem Tier stammende Transplantate (z.B. Rinder-Jugularvenenklappen oder Schweine-Aortenklappen), (Synonym: Heterograft)

ihre mechanischen Gegenstücke, weshalb eine lebenslange antikoagulatorische Behandlung nicht notwendig ist. Die Haltbarkeit dieser Klappenprothesen ist mit etwa 10-15 Jahren jedoch deutlich geringer [24,25]. Kalzifizierungsprozesse und Degeneration der Segel biologischer Klappen bewirken häufig einen strukturellen Schaden, der einen frühzeitigen Ersatz notwendig macht [26]. Bei Kindern sind diese Kalzifizierungsprozesse auf Grund des hohen Stoffwechselumsatzes zudem beschleunigt [27]. Darüber hinaus ist die Verfügbarkeit von Homografts ein limitierender Faktor. Gerade in kleineren Größen steht nur eine sehr begrenzte Klappenauswahl zur Verfügung [28].

Ein gemeinsames Problem aller bisher verfügbaren Klappenprothesen ist das ihnen fehlende Potential sich zu regenerieren und an veränderte Umstände anzupassen. Für pädiatrische Patienten im Speziellen ist dieser Punkt auf Grund des noch zu erwartenden Wachstums schwerwiegend [29]. Bedingt durch die Reoperationen, welche durch Körperwachstum und Klappendegeneration notwendig werden, ergibt sich eine gesteigerte Mortalität [12].

1.4. Implantationsverfahren: chirurgisch vs. minimalinvasiv

Neben der Art der verwendeten Klappe ist auch der Implantationsweg für den Patienten von Bedeutung.

Der chirurgische Herzklappenersatz erfordert die Verwendung der Herz-Lungen-Maschine und ist damit ein sehr aufwendiger und risikobehafteter Eingriff. Auf Grund der Risiko-Nutzen-Abwägung werden Re-Operationen von dysfunktionalen Klappenprothesen häufig länger hinausgezögert um so die Zahl an Eingriffen zu minimieren. Dies wiederum bringt potenziell Risiken, wie die Ventrikeldilatation, für den Patienten mit sich. Ein minimalinvasiver Pulmonalklappenersatz könnte diese Risiko-Nutzen-Abwägung hin zum früheren Klappenersatz verschieben. Er könnte Risiken des Eingriffes, wie myokardiale und neurologische Verletzungen im Zuge des kardiopulmonalen Bypasses sowie Blutungs- und Infektionsrisiken senken. Ebenfalls würde sich der zur Nachbeobachtung notwendige Krankenhausaufenthalt deutlich verkürzen [18].

Bonhoeffer et al. beschrieben 2000 die erstmalige Durchführung eines minimalinvasiven Pulmonalklappenersatzes am Menschen [30]. Sie implantierten

einem 12-jährigen Jungen mit kalzifiziertem Carpentier Edwards Konduit⁴ ein Konduit einer Rinderjugularvene, welche gecrimpt (zusammengepresst, s.u.) in einem Stent per ballonexpandierbarem Katheter über die Femoralvene in Pulmonalklappenposition vorgeschoben und abgelegt wurde.

Nach guten weiterführenden Ergebnissen wurde eine modifizierte Variante dieser Klappe, ebenfalls befestigt in einem ballonexpandierbaren Stent, entwickelt und ist seit 2006 in Europa und Kanada und seit 2010 in den USA unter dem Namen Melody® als erste kommerziell verfügbare Transkatheter-Pulmonalklappe für Patienten zugelassen [31]. Die trikuspidale bovine⁵ Jugularvenenklappe im Platin-Iridium-Stent ist in den Durchmessergrößen 18, 20 und 22 mm erhältlich und wird über eine Schleuse mit 22 Fr.⁶ Außendurchmesser eingebracht [32]. Sie zeigte gute intermediär Follow-up Ergebnisse, wobei Langzeitergebnisse zum jetzigen Zeitpunkt noch ausstehen [33,34]. Jüngere Patienten waren allerdings schon zum bisherigen Analysezeitpunkt ein unabhängiger Risikofaktor für eine Dysfunktionalität der Klappe [35].

Die Melody® Klappe zeigt den Nachteil, dass sie nur auf schon verkalkten Konduits einer vorangegangenen chirurgischen Operation optimalen Halt findet. In den nativen Strukturen des rechtsventrikulären Ausflusstraktes ist dieser Halt auf Grund der Dehnbarkeit nur eingeschränkt gewährleistet [36]. Hierdurch ist das Patientenklientel, welches für die Implantation einer Melody® Klappe in Frage kommt, limitiert.

Eine Alternative zur Melody® Klappe stellt die Edwards Sapien™ Klappe dar. Diese aus bovinem Perikard hergestellte Klappe in einem ballonexpandierbaren Stent aus Edelstahl wurde ursprünglich für den Einsatz als Aortenklappe designt, kann aber auch in Pulmonalklappenposition verwendet werden. Sie ist in den Größen 23 und 26 mm erhältlich (Außendurchmesser der Implantationsschleusen je nach Klappengröße bis zu 24 Fr) und damit für Patienten mit größerem initialen Klappendurchmesser passend [37,38].

Zwar liegen über die Lebensdauer der minimalinvasiv implantierten Klappen noch deutlich weniger Daten als zu den chirurgisch implantierten vor, aber da die verwendeten Klappenmaterialien ähnlich sind, ist eine Verbesserung der

⁴ Konduit = künstliche Prothese als Verbindung zwischen zwei Anteilen des Gefäßsystemes, bzw. des Ventrikels und des nachfolgenden Gefäßanteils

⁵ Vom Rind stammend

⁶ Fr (French) = Medizinische Einheit für das Maß von Kathetern und Kanülen, entspricht etwa einem Drittel-Millimeter Durchmesser

Lebensdauer durch die minimalinvasive Implantation nicht zu erwarten. Die Lebensdauer begrenzenden Faktoren, wie eine verfrühte Kalzifizierung und damit Stenosierung der Klappe und nicht zuletzt das fehlende Wachstum in pädiatrischen Patienten, verbleiben auch hier ein Problem. Hinzu kommen Bedenken über eventuelle Veränderungen der Klappe durch den Crimping-Prozess (s.u.), welcher im Material der Transkatheter-Klappen möglicherweise bleibende Schäden hinterlässt [39,40].

1.5. Tissue-Engineering

1.5.1. Allgemeine Übersicht zum Tissue-Engineering

Einen Weg die Problematik der fehlenden Anpassung an veränderte Umwelteigenschaften und des fehlenden Wachstums der Klappe zu überwinden, bietet möglicherweise das sogenannte „Tissue-Engineering“ (Gewebezüchtung). Tissue-Engineering ist die Herstellung biologischer Gewebe durch Kultivierung von Zellen, welche nachfolgend zum Wachstum auf einer vordefinierten Struktur angeregt werden. Diese Methode bietet die Möglichkeit, ein erkranktes Organ bzw. einen Organteil durch ein artifiziell erstelltes zu ersetzen [41].

Durch das Tissue-Engineering könnten Limitationen wie etwa die Notwendigkeit der Antikoagulationstherapie überwunden werden, da es sich bei dem entstehenden Gewebe um annähernd körpereigenes Material handeln würde. Ebenfalls wäre ein Engpass an Homograft-Spenden keine Beschränkung mehr. Sogar noch weitergehend wäre es möglich, die Klappen in der genau für den Empfänger passenden Größe zu produzieren. Weiterhin wäre eine Anpassung des Gewebes an sich verändernde Umgebungsbedingungen durch Umbauprozesse oder sogar Wachstum möglich.

Verschiedene Ansätze des Tissue-Engineerings sind derzeit Teil der Forschung. Hierbei werden im Wesentlichen drei Hauptansätze unterschieden [42]:

1. das klassische Tissue-Engineering, bei welchem ein biodegradierbarer Scaffold mit Zellen besiedelt und nachfolgend in einem Bioreaktor⁷ kultiviert wird

⁷ Der Bioreaktor ist ein System, in welchem die Klappe auf ihre Anforderungen im Organismus konditioniert wird. Er setzt die Klappen Belastungen aus, so dass sich die Fasern durch Spannung im Material entsprechend der wirkenden Zugkräfte anordnen und Zellen entlang einer vordefinierten Struktur wachsen.

2. dezellularisierte⁸ Homo- oder Xenografts, welche als Matrize dienen und mit Zellen besiedelt und kultiviert werden
3. dezellularisierte Homo- oder Xenografts, welche (ohne vorhergehende in vitro Kultivierungsphase) in vivo repopularisieren und so die Möglichkeit für Umbau-Prozesse erhalten.

Zwischen den drei Hauptansätzen gibt es in der modernen Forschung weitere Übergangsstufen, die z.B. das klassische Tissue-Engineering mit einem Dezellularisierungsprozess vereinen.

1.5.2. Dezellularisierte Homo- und Xenografts

Dezellularisierte Homo- und Xenografts haben bereits sehr vielversprechende präklinische und klinische Ergebnisse als Herzklappenprothesen und damit Startermatrizen für Zellwachstum erzielt. Eine Berliner Gruppe konnte gute Erfolge mit dezellularisierten porcinen⁹ Pulmonalklappen, sowohl im Schafsmodell als auch im klinischen Versuch am Menschen, vorweisen [43,44]. Die dezellularisierten Schweinepulmonalklappen zeigten ein Ausbleiben von stenotischen Veränderungen, Regurgitation und Kalzifizierung bei gleichzeitig erfolgter in vivo Re-Popularisierung der Klappe mit Endothel- und interstitiellen Zellen. Neuere Studien zu diesem Klappenmodell zeigten allerdings negative Kurz- und Langzeitergebnisse im Menschen [45,46]. Voges et al. berichteten von einem rapiden Versagen der Klappe. In ihrer Studie mussten 14 von 26 Implantaten (52%) innerhalb eines medianen Follow-ups von nicht einmal 2 Jahren ersetzt werden. Die guten Ergebnisse bezüglich der Wiederbesiedelung der Klappe konnten von ihnen nicht bestätigt werden. Diese Erkenntnisse brachten sie zu der Empfehlung die Klappen, bekannt unter dem Namen Matrix P® und Matrix P plus®, nicht mehr zu verwenden [47]. Nichts desto trotz ist eine modifizierte Version der dezellularisierten porcinen Pulmonalklappe in einem dezellularisierten equinen¹⁰ Perikardpatch unter dem Namen Matrix P plus N™ im Rahmen der Ross-Operation¹¹ derzeit für den Markt zugelassen [48].

⁸ Dezellularisierung ist die Entfernung von auf der Klappe befindlichen Zellen und sämtlichem auf der Klappe befindlichem DNA-haltigen Materials

⁹ Vom Schwein stammend

¹⁰ Vom Pferd stammend

¹¹ Verfahren in dem eine erkrankte Aortenklappe durch die körpereigene Pulmonalklappe ersetzt wird. Anstelle der Pulmonalklappe wird nachfolgend ein Homograft eingesetzt.

Im Bereich der dezellularisierten und wiederbesiedelten Homografts konnte die Gruppe um Axel Haverich wertvolle Ergebnisse sowohl im Labor und im Tierexperiment als auch in der klinischen Forschung erzielen. Diese Gruppe verwendete Homografts der Pulmonalklappe, dezellularisierte diese und kultivierte sie nachfolgend mit Zellen von Patienten. Nach erfolgreichen Erprobungen dieser Herstellungsart im Labor und in der präklinischen Forschung im Schafsmodell [49-51], fanden die Klappen nachfolgend sogar erste klinische Anwendung. Die in zwei pädiatrische Patienten implantierten Pulmonalklappen zeigten gute Ergebnisse in einem Follow-Up von 3,5 Jahren. Dabei zeigte sich eine Zunahme des Durchmessers des Pulmonalklappenannulus bei gleichzeitiger Abnahme der zu Beginn milden Regurgitation. Dieser Aspekt wurde von den Autoren als Wachstum der Klappe interpretiert [52].

Dennoch bleiben bei beiden Möglichkeiten etwaige Risiken und Probleme vorhanden. Auch wenn Studien zu gegensätzlichen Ergebnissen kommen, stehen Xenografts noch immer in der Diskussion zoonotische Krankheitserreger übertragen zu können [53,54]. Homografts wohnt das Problem begrenzter Verfügbarkeit geeigneter Transplantate, gerade für sehr junge Patienten, inne [28]. Diese Eigenschaften lassen sie bisher nicht als eine optimale Therapiemethode erscheinen.

1.5.3. „Klassisch“ tissue-engineerte Herzklappen

Vollständig tissue-engineerte Herzklappen auf Basis eines synthetischen biodegradierbaren Scaffolds haben es bisher noch nicht in die klinische Erprobungsphase oder gar routinemäßige Anwendung geschafft. Shinoka et al. berichteten 1995 erstmalig von dem Ersatz eines Pulmonalklappensegels mit einem auf Basis eines biodegradierbaren Scaffolds gezüchteten autologen Segel im Schafsmodell [55]. Seitdem hat es viele Fortschritte im Bereich des klassischen Tissue-Engineerings von Herzklappen gegeben. In vitro Ergebnisse wie auch präklinische Versuchsreihen im Tiermodell zeigen vielversprechende Ergebnisse und lassen die Einkehr derartiger Klappenersatzverfahren in die Klinik näher rücken [56-61].

In der aktuellen Forschung werden für die Versuche verschiedene Scaffoldmaterialien und Zellen verwendet [62]. Der Scaffold dient dabei als Matrize, die ein gutes Anhaften und Einwachsen der auf ihn gesäten Zellen ermöglicht,

ausreichenden Halt bietet, bis die auf ihn gesäten Zellen eine eigene suffizient starke Matrix geschaffen haben, und nachfolgend ohne schädliche Abbauprodukte degradiert. Eine Kombination aus Polyglykolsäure und Poly-4-Hydroxybutyrat (PGA/P4HB) hat sich dafür bereits tauglich gezeigt [57,62]. Im Bereich der Zellen stellten sich venöse Myofibroblasten auf Grund der einfachen Entnahmebedingungen, ihrer guten Kollagenproduktion und der daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften als geeignet heraus [63].

Jüngst wurde ein Verfahren entwickelt, welches den sehr aufwendigen Produktionsprozess klassisch tissue-engineerter Klappen deutlich vereinfacht und unabhängig von der Verwendung autologer¹² Zellen macht. Die Verbindung mit einem an die Kultivierung der Klappe angeschlossenen Dezellularisierungsprozess bietet neben verbesserten mechanischen Eigenschaften der Klappe auch Vorteile bezüglich der logistischen Anwendbarkeit des Verfahrens und seiner kostentechnischen Umsetzbarkeit [64,65]. Die Dezellularisierung entfernt sämtliches Zellmaterial der Klappe, so dass nur deren bindegewebige Matrix verbleibt. Die so gewonnene Klappenmatrix kann ohne Probleme über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Somit könnten die fertigen Klappen im Krankenhaus in allen gewünschten Größen bereitgestellt werden. Lange Zeitabschnitte zwischen der Indikationsstellung zu einem Herzklappenersatz und dessen Durchführung, wie sie für einen autologen Klappenersatz aus patienteneigenen Zellen nach dem klassischen Tissue-Engineering Verfahren notwendig wären, könnten durch die Verwendung dezellularisierter Klappen umgangen werden. Es bestände die Möglichkeit dem Patienten unmittelbar nach Indikationsstellung eine Herzklappe zu implantieren, welche sich nachfolgend in seinem Körper mit autologen Zellen repopularisieren könnte [64].

1.5.4. Minimalinvasive Implantation tissue-engineerter Herzklappen

Wie bei den bisher verwendeten Herzklappenprothesen würde auch im Bereich der tissue-engineerten Herzklappen eine minimalinvasive Implantation enorme Vorteile mit sich bringen.

Die Schweizer Arbeitsgruppe um Simon P. Hoerstrup beschrieb eine minimalinvasive Implantation einer klassisch tissue-engineerten Herzklappe sowohl in Aorten- als

¹² Autolog = zum selben Individuum gehörig

auch in Pulmonalklappenposition. Hierbei wurde die transapikale Implantation über eine Mini-Sternotomie gewählt [65,66].

Während mit anderen Tissue-Engineering-Konzepten auf Basis dezellularisierter Xenografts bereits Versuche zur transkutanen Implantation von Pulmonalklappen über einen peripher gelegenen Gefäßzugang unternommen wurden [67], bestehen derzeit unseres Wissens nach noch keine Daten über die transkutane Implantation klassisch tissue-engineerter Herzklappen auf Basis eines biodegradierbaren Scaffolds. Dieser Zugang wäre noch deutlich weniger invasiv als der von Hoerstrups Gruppe durchgeführte transapikale Ansatz und würde damit eine minimale Belastung für den Patienten bedeuten.

1.6. Das Schaf als Tiermodell

Schafe sind das etablierte Tiermodell für Versuche zu kardiovaskulären Implantaten. Sie bieten eine dem menschlichen Organismus sehr ähnliche Anatomie und weitgehend übereinstimmende hämodynamische Verhältnisse. Weiterhin ist der Umgang mit Schafen, verglichen mit anderen Tierarten wie z.B. Hunden, relativ unkompliziert und sie sind gut verfügbar [68].

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt der beschleunigte Kalziummetabolismus im Schafmodell dar. Schafe sind somit ein sog. „worst case model“ und lassen in einer relativ kurzen Zeit auf eine mögliche Kalzifizierung des Implantats schließen [69].

1.7. Fragestellung und Hypothesen

Die Entwicklung einer Herzklappe, welche eine lebenslange Haltbarkeit aufweist, keine Antikoagulation benötigt, adäquate Flusseigenschaften liefert, leicht zu implantieren ist, keine Risiken für Infektion oder immunologische Reaktionen birgt und die das Potential zu wachsen und sich im Körper des Patienten zu regenerieren mitbringt, muss das Ziel der modernen Medizin sein [70].

Das Tissue-Engineering von Herzklappen bringt möglicherweise alle Voraussetzungen für die Entwicklung einer solchen Herzklappe mit [71].

„Life Valve“ ist ein im 7. Forschungsrahmenprogramm der Europäischen Union gefördertes Projekt, welches im Jahr 2010 startete (Grand Agreement No. 242008) und in dessen Rahmen die hier beschriebenen Arbeiten durchgeführt worden sind. Ziel der Projektpartner (Deutsches Herzzentrum Berlin, die Universitäten Zürich, Eindhoven und Wien sowie industrielle Partner) war es die Eigenschaften einer

tissue-engineerten Herzklappe mit den Vorteilen der minimalinvasiven Implantation zu kombinieren. Vorhergehende Versuche der Arbeitsgruppe um Simon P. Hoerstrup konnten bereits die Vorteile der Dezellularisierung von klassisch tissue-engineerten Herzklappen zeigen, weshalb hier auf diese Methode zurückgegriffen wurde [64].

Die Universitäten Zürich und Eindhoven bearbeiteten besonders die in-vitro Entwicklung der tissue-engineerten Herzklappe. Hauptaufgabe des Deutschen Herzzentrums Berlin war es ein Kathetersystem zur Implantation der Klappe zu entwickeln sowie die Tierversuche zur minimalinvasiven in-vivo Implantation und die nachfolgenden Analysen vorzunehmen.

Das Ziel dieser Arbeit war es dabei, herauszufinden, wie sich eine dezellularisierte Klappe, welche zuvor auf Basis eines bioresorbierbaren Scaffolds im Bioreaktor mit vaskulären Myofibroblasten gezüchtet wurde, transkutan mittels Katheter in die Pulmonalklappenposition eines Schafes implantieren lässt. Dabei sollten mögliche Probleme der Implantation evaluiert werden um Daten für einen möglichst optimalen Implantationskatheter gewinnen zu können.

Anschließend sollte betrachtet werden, wie sich die dezellularisierte tissue-engineerte Klappe (dTE-Klappe) über einen Nachbeobachtungszeitraum von bis zu 24 Wochen im Körper der Versuchstiere verhält. Ein spezielles Augenmerk sollte darauf gelegt werden, in wie weit eine natürliche Hämodynamik durch die Klappe erzielt werden kann. Hierbei sollte evaluiert werden, ob eine Stenosierung auftritt und ob die Klappe suffizient ein Zurückfließen von Blut aus der Pulmonalarterie in den rechten Ventrikel verhindert. Es sollte beobachtet werden, ob bekannte Probleme bereits verwendeter biologischer Klappenprothesen, wie etwa die Kalzifizierung der Klappe, bei diesem Verfahren ebenfalls auftreten. Das dazu gewählte Schafsmodell, in welchem mögliche Kalzifizierungsprozesse beschleunigt sind, sollte zur möglichst optimalen Beurteilbarkeit dieses Faktors beitragen.

Daten über das Verhalten des selbstexpandierbaren Stents, in welchem die Klappe in den Körper eingebracht wird, sollten generiert werden.

Des Weiteren sollte, aus dem Ansatz heraus dieses Verfahren als mögliche wachsende Alternative bei pädiatrischen Patienten einsetzen zu können, beobachtet werden, ob ein Umbau der Klappenstrukturen im Körper stattfindet und wie sich dieser histologisch darstellt.

2. Methoden

2.1 Tiere

Fünfzehn adulte weibliche Tiere der Rasse „Graue gehörnte Heidschnucke“ wurden zwischen November 2011 und Oktober 2012 über einen Lieferanten bezogen. Die Tiere entstammten dreier verschiedener Zuchtbetriebe in Berlin/Brandenburg und wurden durch die Züchter auf ein Alter von etwa 3-4 Jahren geschätzt.

Die Tierhaltung sowie die Versuche erfolgten in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité Universitätsmedizin Berlin, welche nach EN DIN ISO 9001:2000 zertifiziert ist.

Bei den Versuchen wurden die Richtlinien der europäischen und deutschen Gesellschaften für Versuchstierkunde (FELASA, GV-SOLAS) eingehalten. Ein am 27.07.2011 bewilligter Tierversuchsantrag mit der Nummer G0111-11 liegt vor.

In der FEM wurden die Tiere artgerecht ausschließlich mit Tieren des gleichen Versuches zusammen in einem Stall gehalten. Die Überwachung erfolgte durch tagsüber durchgängig anwesende Tierpfleger der Einrichtung sowie die Tierärzte des Versuchsteams.

Die Tiere wurden zweimal täglich mit Heu gefüttert. Vor Eingriffen wurde das entsprechende Tier für 24 Std. nüchtern und auf Holzspäne gesetzt. Am Morgen des Versuchstages wurde die Tränke abgestellt.

Eines der Tiere verstarb noch vor Implantation an einer Lungeninfektion, weshalb es durch ein weiteres Tier ersetzt wurde.

Die Einteilung der Tiere für den Versuch erfolgte in drei Gruppen mit unterschiedlich langem Nachbeobachtungszeitraum, nach welchem die Schafe getötet wurden (Abbildung 2).

Die Benennung der Tiere wurde auf Grund vorangegangener Versuche in die Nummern 11B1 bis 25D5 durchgeführt.

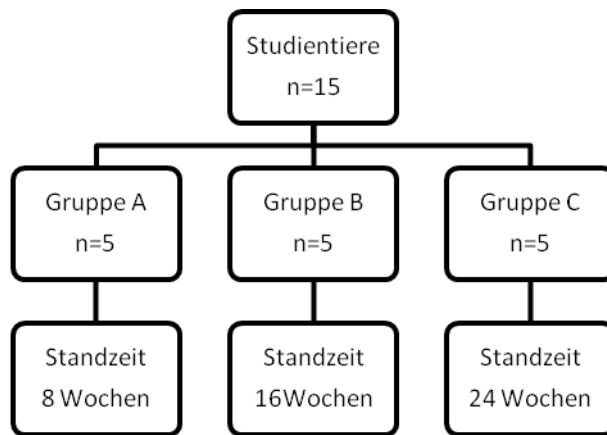


Abbildung 2: Gruppeneinteilung der Studientiere. Je 5 der 15 Studientiere wurden in die Follow-up Gruppen 8, 16 und 24 Wochen aufgeteilt.

2.2. Ablagesystem

Um den verwendeten Klappenstent des Versuches zielgenau implantieren zu können, wurde auf Grund fehlender kommerzieller Alternativen für die Versuche ein eigenes Ablagesystem (Katheter) entwickelt [72]. Dieses bestand grob zusammengefasst aus Handgriff, Außen- und Innenkatheter sowie einer abschließenden Spitze (Abbildung 3).

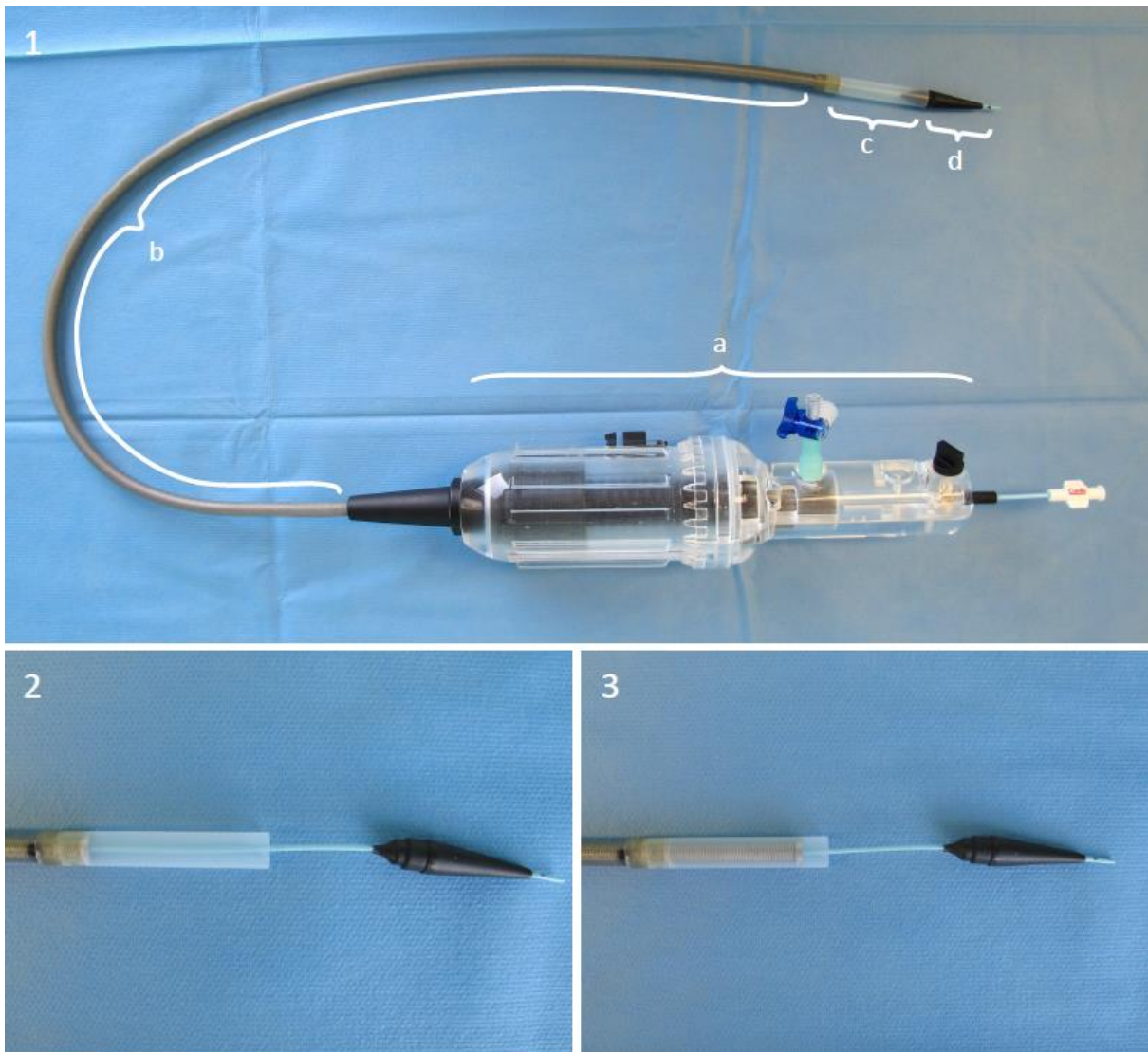


Abbildung 3: Ablagesystem. Bild 1 zeigt eine Gesamtaufnahme des Katheters. Hierin gekennzeichnet sind Handgriff (a), Außenkatheter mit eingelegtem Innenkatheter (b), an der Spitze des Außenkatheters verklebte Kapsel (c), Katheterspitze (d). Bild 2 und 3 zeigen die Kapsel, in welcher der Klappenstent nach dem Crimping platziert wird. In Bild 2 steht der Außenkatheter noch soweit über den Innenkatheter vorgeschoben, dass Platz in der Kapsel ist. Bild 3 zeigt die Position, in der der Katheter vorliegt, wenn der Stent ausgeworfen wurde. Der Außenkatheter ist leicht über den Innenkatheter zurückgezogen, so dass kein Platz mehr in der Kapsel für den Stent verbleibt.

Durch den Handgriff wurde mittels einer Schraube eine Linearbewegung auf den Außenkatheter übertragen, durch welche sich dieser über den Innenkatheter vor und zurückschieben ließ.

Der an den Handgriff angeschlossene Außenkatheter (Vistamed innovative catheter solutions, Carrick-on-Shannon, Irland) kann vereinfacht als Schlauch betrachtet werden. Er bestand aus drei verschiedenen Schichten (von innen nach außen):

1. Polytetrafluorethylen-Schicht (Teflon)
2. Edelstahl-Braiding: eine Art Maschendraht, durch den eine Verlängerung des Außenkatheters durch die einwirkenden Kräfte beim Zurückziehen im Zuge der Stentfreisetzung vermieden wurde.
3. Pebax: ein thermoplastisches Elastomer mit guter Flexibilität. Es wurde in zwei unterschiedlichen Härtegraden verbaut. Der handgriffnahe Abschnitt wies eine Härte von Shore 40D auf. Dies ermöglichte eine gute Verschiebbarkeit. Der distale Abschnitt bestand aus einem weicheren Pebax mit einer Härte von Shore 30D. Hierdurch wurde eine bessere Biegsamkeit gewährleistet, so dass der Katheter leichter durch das Herz manövriert werden konnte.

Der Außenkatheter hatte einen Außendurchmesser von 7,3 mm (22 Fr) und einen Innendurchmesser von 6,2 mm (19 Fr).

Abhängig davon wie weit die Klappe gecrimpt werden konnte (s.u.), wurde auf den Außenkatheter entweder eine Kapsel (HDPE =Polyethylen) mit Außendurchmesser 8,6 mm (26 Fr) oder 10,6 mm (32 Fr) und einem Innendurchmesser von 8 mm (24 Fr) bzw. 10mm (30 Fr) aufgesetzt.

Innerhalb des Außenkatheters verlief eine Spirale (Innenkatheter). Die Spirale (Shannon Coiled Springs, Limerick, Irland) hatte einen Außendurchmesser von 5,8 mm. Sie diente beim Zurückziehen des Außenkatheters als Widerlager für den an ihrer Spitze liegenden Stent und ermöglichte so dessen Freisetzung. Um eine Verzahnung im Stent zu vermeiden, saß der Spirale an ihrem Ende ein Abschluss auf.

Als innerer Abschluss des Systems (also innerhalb der Spirale verlaufend) diente ein 4 Fr Multipurpose Katheter (Cordis Corporation, Bridgewater, USA), auf dessen vorderen Ende eine Spitze (Speedpart GmbH, Hasloch/ Main, Deutschland) verklebt war. Diese Spitze konnte bis an das vordere Ende der Kapsel zurückgezogen werden. Die Spitze bildete so einen Abschluss, der die Verletzung des Gefäßes durch die kantige Struktur der Kapsel verhinderte. Durch ihr elastisches Material (Polyurethan) erleichterte sie außerdem die Einleitung der starken Biegung im Ventrikel. Der rückseitige Anteil der Spitze wurde nach ersten Versuchsergebnissen ähnlich dem vorderen angeschrägt um eine Verletzung der Klappensegel beim Zurückführen des Katheters zu verhindern.

Das System wurde auf einem ultrasteifen Draht (Amplatz Ultra Stiff, Cook Medical, Bloomington, USA) geführt, welcher zuvor in den Körper eingebracht wurde.

2.3. Klappen

Dezellularisierte tissue-engineerte Herzklappen (n=15) wurden auf Basis eines Scaffolds aus bioresorbierbarem Material produziert. Auf diesem wurden in einem Bioreaktor Zellen zur Bildung extrazellulärer Matrix (EZM) angeregt. Nach Bildung der EZM wurden die lebenden Zellen von der Klappe durch Dezellularisierung entfernt. Die Produktion der Klappen erfolgte durch Xeltis-BV in Eindhoven in den Niederlanden.

2.3.1. Scaffold

Ein Scaffold ist eine Matrize für das Wachstum der später aufgebrachten Zellen. Der in diesem Versuch verwendete Scaffold bestand aus einem Polyglykolsäure-Gewebe (PGA, Stärke 1,0 mm, spezifisches Gewicht 70 mg/cm³; Cellon, Bereldange, Luxemburg), überzogen mit einer Schicht aus 1,75% Poly-4-Hydroxybutyrat (P4HB; TEPHA Inc., Lexington, USA) in Tetrahydrofuran (Fluka; Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

Der Scaffold wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene 4-0, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) im selbstexpandierenden Nitinolstent vernäht. Hierzu wurden zwei zirkulär verlaufende Nähte am oberen und unteren Ende des Stents sowie Einzelknopfnähte am Sinus hinter den Klappensegeln verwendet.

2.3.2. Zellgewinnung

Um tierartspezifisches Zellmaterial für die Klappen zu gewinnen, wurden im Vorlauf des eigentlichen Versuches vaskuläre Zellen aus der Vena jugularis interna von 5 Versuchstieren gewonnen. Ein Zellpool wurde gebildet.

Hierzu wurde ein 6 cm langes Stück der Vena jugularis interna chirurgisch entnommen. Die Venenstümpfe wurden mittels einer Tabaksbeutelnaht chirurgisch versorgt und die Wunde verschlossen. Das Resektat wurde mit phosphatgepufferter Salzlösung (kurz PBS von Englisch „phosphat buffered saline“, Gibco, Darmstadt, Deutschland) gespült, um das Lumen von Blut zu befreien und die Nährstoffversorgung der Endothelzellen zu ermöglichen. Anschließend wurde das Zellmaterial in Medium-199 (Gibco, Paisley, Schottland) inkubiert verschickt.

2.3.3. Klappenproduktion

Der weitere Prozess der Klappenherstellung entsprach dem Prozedere wie es zuvor von anderen Gruppen beschrieben wurde [64,73].

Zusammengefasst heißt das: Myofibroblasten wurden identifiziert und in DMEM Advanced Medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA) angereichert mit 10% Lamm Serum (Gibco, Invitrogen), 1% GlutaMax (Gibco, Invitrogen) und 1% Penicillin-Streptomycin (Lonza, Verviers, Belgien) expandiert.

Anschließend wurden sie mit einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/cm² auf die Scaffolds gesät, wobei Fibrin als Zellüberträger fungierte. Das Produkt wurde in einem Bioreaktor [74] für 4 Wochen inkubiert, während das Tissue-Engineering-Medium (DMEM Advanced, angereichert mit 0.1% Lamm Serum, 1% GlutaMax, 1% Penicillin-Streptomycin und L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (0.25 mg/ml; Sigma-Aldrich)) alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Die ersten 5 Tage im Bioreaktor verblieben die Klappen in geschlossener Position (Segel verwachsen) bei einem diastolischen Gradienten von 3 mmHg im System. An den folgenden vier Tagen wurde der Druck schrittweise auf 15mmHg erhöht. Er verblieb auf diesem Level für den Rest der vier Wochen.

2.3.4. Dezellularisierung

Im Anschluss an die vier Wochen im Bioreaktor wurden die Klappen in PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen und über Nacht durch die Inkubation in PBS zugesetzt mit 0,25% Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,25% Natriumdesoxycholat (SD, Sigma-Aldrich) und 0,02% EDTA (Sigma Aldrich) bei 37°C dezellularisiert. Folgend wurden die Klappen wiederum in PBS gewaschen und Nukleinsäurereste mit einer Verdauungslösung aus 50 mM TRIS-HCl Puffer (Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Merck)) und absteigenden Konzentrationen an Benzonase® (25 units/µl, Novagen, Madison WI, USA) entfernt. Die Klappen wurden folgend in PBS gewaschen und anschließend in M-199 Medium (Gibco, Invitrogen) für mehr als 24 Stunden bei 4°C gebadet um verbleibende Zellreste zu entfernen.

Anschließend wurden die Klappen in PBS gewaschen um das Medium zu entfernen und nachfolgend in 70% EtOH (70% reines Ethanol (VWR international, Fontenay-Sous-Bois, Frankreich) und 30% autoklaviertem Reinwasser) für 30 min sterilisiert.

Abschließend wurden sie in sterilem PBS gewaschen. Alle Schritte wurden unter kontinuierlichem Schütteln ausgeführt [64].

2.4. Stents

Die Klappen wurden in selbstexpandierbaren Nitinolstents (PFM Medical AG, Köln, Deutschland) vernäht. Die Stents (Abbildung 4) hatten im radial voll expandierten Zustand bei 37° Celsius eine Größe von 30 x 30 mm. Hergestellt wurden die Stents aus einem Rohr mit 4,3 mm Durchmesser. Das geschnittene Rohr wurde zur Einstellung der Pseudoelastizität dilatiert und einer Wärmebehandlung unterzogen.

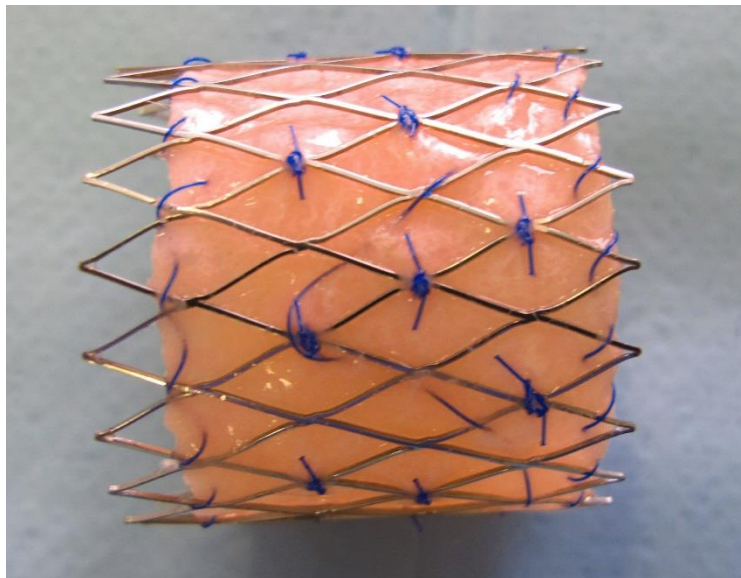


Abbildung 4: Selbstexpandierbarer Nitinolstent mit eingenähtem Klappenkonduit

2.5. Crimping

Um den Klappenstent in das Ablagesystem zur Implantation zu laden, war es notwendig ihn auf eine Größe von entweder 8 oder 10 mm passend zur jeweilig verwendeten Kapsel zu komprimieren. Die Komprimierung erfolgte mittels des Edwards Crimping-Gerätes (Edwards Lifescience Corporation, Irvine, USA) direkt vor der Implantation im Operationssaal.

Nach Herausnahme der Klappe aus der Transportlösung und Abtropfen dieser, wurden die bis zu diesem Zeitpunkt noch verwachsenen Lunulae mittels Skalpell manuell eröffnet. Folgend wurde der Klappenstent im Crimping-Gerät durch zirkulären Druck langsam komprimiert. Die Klappensegel wurden bei Fehlfrage

manuell mit Hilfe einer Pinzette in die richtige Position gebracht. Anschließend wurde der Stent direkt aus dem Crimping-Gerät in die Kapsel des Ablagesystems geschoben (Abbildung 5).



Abbildung 5: Crimping. Oben links: Crimping-Gerät mit Klappenstent in der Übersicht, oben rechts: Einschieben des gecrimpten Stents in den Katheter, unten: Crimpingablauf. Der 30mm im Durchmesser betragende Stent wurde langsam auf eine Endgröße von 8 oder 10mm gecrimpt um ihn nachfolgend in das Ablagesystem einschieben zu können. Die Abbildung stellt verschiedene Stufen des Crimpings dar. Die Millimeterangabe am unteren Bildrand gibt den Außendurchmesser des Stents zum jeweiligen Zeitpunkt an.

2.6. Versuchsablauf

2.6.1. Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen

Vor Implantation erfolgte in einem separaten Eingriff ein CT zur Erfassung der Klappen- und Gefäßparameter.

Die Implantation erfolgte in einem Eingriff mit vorausgehender intrakardialer Echokardiographie (ICE), invasiver Druckmessung und Angiographie. Direkt nach Implantation wurden diese Untersuchungen wiederholt um die Funktion und Positionierung der Klappe zu beurteilen.

Routinemäßig fand bei jedem Schaf eine Woche nach Implantation und eine Woche vor Explantation ein CT statt.

Alle vier Wochen nach Implantation wurde eine Kontrolle der Klappenfunktion und Klappenlage mittels ICE durchgeführt.

Die Explantation erfolgte ebenfalls nach unmittelbar vorhergehender Untersuchung mittels ICE, Druckmessung und Angiographie (Abbildung 6).

Näheres zu den einzelnen Untersuchungen s.u.

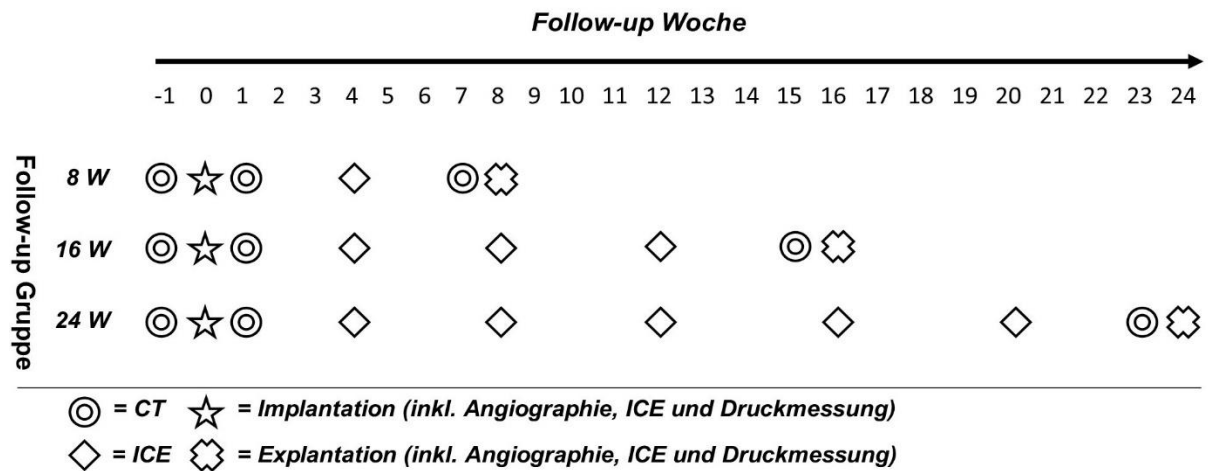


Abbildung 6: Schematische Übersicht zum zeitlichen Versuchsablauf

2.6.2. Anästhesie und Monitoring

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde die Einleitung der Tiere mit 7,5-15 mg/kg Thiopental und 1-2,5 mg/kg Propofol vorgenommen. Nachdem die Implantation bei allen Tieren erfolgt war, wurde der Ansatz während der Versuchsreihe auf Grund von zu starker Schleimbildung in den Atemwegen mit gelegentlich zeitweise auftretenden Atemstillständen verworfen.

Die weitere Versuchsreihe wurde unter Hinzunahme einer Prämedikation mit 0,4-0,6 mg/kg Midazolam i.m. (Dormicum®, Roche, Wien, Österreich) und 0,1-0,2 mg/kg Butorphanol i.m. (Alvegesic®, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) durchgeführt. Die Prämedikation wurde zur Beruhigung der Tiere noch im Stall verabreicht.

Es folgte die Einleitung der Schafe mit 0,1-0,2 mg/kg Midazolam i.v. (Dormicum®, Roche, Wien, Österreich) und 2,5-3,5 mg/kg Propofol i.v. (Propofol-Lipuro 1%®, Braun, Melsungen, Deutschland). Im Anschluss wurden die Schafe intubiert. Um eine durchgehend gute Sauerstoffsättigung zu gewährleisten, wurde der Sauerstoffpartialdruck durch externe O₂-Zufuhr stets etwas über den physiologischen Werten gehalten. Ein Austrocknen der Augen während der Eingriffe wurde durch nach der Einleitung aufgetragene Augensalbe (Bepanthen®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) verhindert.

Je nach Prozedur wurden unterschiedliche Narkoseschemata verwendet.

Für CT- und ICE-Untersuchungen verwendeten wir eine Kombination aus 6-12 mg/kg/h Propofol (Propofol-Lipuro 1%®, Braun, Melsungen, Deutschland) und 3-15 mg/kg/h Ketaminhydrochlorid (Ketamin-Actavis®, Actavis, München, Deutschland) je i.v. per Perfusor appliziert.

Für die Implantationen und Explantationen und die hiermit einhergehenden Untersuchungen wurde eine Kombination aus 0,005-0,015 mg/kg/h Fentanyl i.v. per Perfusor (Fentanyl Janssen, Neuss, Deutschland) und Isofluran Inhalationsnarkose (Forene®, Abbott GmbH und Co KG, Wiesbaden, Deutschland) per Anästhesie Ventilator (Cato®, Dräger, Lübeck, Deutschland) verwandt. Zusätzlich wurden 3-5 mg/kg Amiodaron i.v. (Cordarex®, Sanofi Aventis, Frankfurt am Main, Deutschland) und 0,02 mg/kg Magnesiumaspartat-HCl 3H₂O i.v. (Magnesiocard®, Inresa, Freiburg, Deutschland) per Perfusor verabreicht um eventuellen Herzrhythmusstörungen durch die Katheterisierung vorzubeugen.

Weiterhin erhielten die Schafe 5-10 ml/kg/h Vollelektrolytlösung (Jonosteril®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) plus eine zusätzliche Gabe von 60 ml/kg für die 24h vorausgegangener Nüchternheit.

Nach der Gefäßpunktion zur Einbringung des Ablagesystems wurde Heparin (Heparin Natrium 5000-Ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) in einer Dosierung von 100 IE/kg verabreicht um eine direkte Gerinnung am Implantat zu verhindern.

Während der Narkose standen die Tiere unter Monitoring mittels EKG, Pulsoxymetrie und rektaler Temperatursonde.

Nach Ablage des Klappenstents erhielten die Tiere zur Infektionsprophylaxe Ampicillin/Sulbactam 3 g (Unacid®, Pfizer, Berlin, Deutschland) i.v..

Nach Beendigung der Narkose und Extubation wurden die Schafe tierärztlich beobachtet, bis ein sicherer Stand und Fressen festgestellt werden konnte. Nach Abklingen der Betäubung wurden die Tiere routinemäßig mit Flunixin (Finadyne®, Schering, Segre, Frankreich) oder Buprenorphin (Tamgesic®, RB Pharmaceuticals Limited, Slough, Großbritannien) analgetisch versorgt. Ab dem Folgetag nach Implantation wurden ASS 100 mg oral (Merkle, Blaubeuren, Deutschland) und Dalteparin-Natrium 5000 IE (Fragmin®, Pfizer, Berlin, Deutschland) subkutan fünf Tage zur Antikoagulation verabreicht.

Die Tötung der Tiere vor Explantation erfolgte durch die Gabe einer Überdosis Propofol und 1 ml/kg Kaliumchlorid i.v. (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland).

2.6.3. Lagerung bei den Eingriffen

Während der Eingriffe wurden die Tiere zur optimalen Zugänglichkeit für den Operateur in Rückenlage positioniert. Die Klauen wurden gepolstert und fixiert. Für die CT-Untersuchungen befanden sich die Tiere in Bauchlage.

2.6.4. Computertomographie

Die EKG-getriggerte Computertomographie (Siemens Somatom Definition AS 64, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) wurde mit einer Schichtdicke von 0,75mm und 2-2,5 ml Kontrastmittelinfusion (Imeron 400 MCT, Bracco Imaging GmbH, Konstanz, Deutschland) vor der Implantation, eine Woche nach der Implantation und eine Woche vor der Explantation durchgeführt. Sie diente der Erfassung von Pulmonalarterien- und Pulmonalklappengröße sowie von Stentform und -durchmesser. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der kommerziell erhältlichen Syngo VE31H Software (Siemens AG, Erlangen, Deutschland).

2.6.5. Implantationsprozedur

Nach Einleitung der Schafe in die Narkose wurde nach zusätzlicher Lokalanästhesie mit Lidocain (Braun, Melsungen, Deutschland) unter Ultraschallkontrolle (Vivid Q, GE Healthcare, USA) die Vena femoralis links als Zugang für die Angiographie und die Arteria femoralis links als Zugang für den Blutdruckmesskatheter mit einer 5 Fr bzw. 4 Fr Schleuse (St. Jude Medical, Minnetonka, USA) versehen.

Die Punktion der Vena jugularis links erfolgte anschließend als Zugang für den ICE- und später den Implantationskatheter. Eine 9 Fr Schleuse wurde zum Beginn an diesem Ort eingelegt.

Es folgten die Angiographie, ICE und Druckmessung. Anschließend wurde der Zugang an der Vena jugularis mittels handelsüblicher Dilatatoren (Edwards Lifescience Corporation, Irvine, USA) bis auf eine Größe von 26 Fr oder 32 Fr für die Einführung des Implantationskatheters aufgeweitet.

Der Klappenstent wurde nach dem Crimping in das Ablagesystem geladen. Über einen Führungsdraht (Amplatz Ultra Stiff, Cook Medical, Bloomington, USA) wurde das Ablagesystem unter Durchleuchtung mittels C-Bogen (BV Pulsera, Phillips

Healthcare, Eindhoven, Niederlande) bis in Pulmonalklappenposition vorgeschoben. Die Ablage erfolgte direkt über der nativen Klappe, so dass deren Segel gegen die Gefäßwand gepresst und damit vollständig vom Blutstrom ausgeschlossen wurden. Nach erfolgreicher Ablage wurde eine Tabaksbeutelnaht an der Vena jugularis angelegt, welche nach Einlegen einer 11 Fr Schleuse für den ICE festgezogen wurde.

Sofort im Anschluss an die Implantation wurden die Lage und die Funktion der neu eingesetzten Herzklappen mittels Angiographie, ICE und Druckmessung überprüft.

2.6.6. Intrakardiale Echokardiographie (ICE)

Die intrakardiale Echokardiographie diente zur Funktionseinschätzung der Klappe. Sie wurde mittels kommerziell erhältlicher 8 Fr und 10 Fr Ultraschallkatheter (AcuNav, Siemens, Erlangen, Deutschland) und einem Vivid Q Ultraschallgerät (GE Healthcare, Tirat Carmel, Israel) durchgeführt. Der Zugang erfolgte über die 9 Fr oder 11 Fr Schleuse in der Vena jugularis. Der Ultraschallkatheter wurde vorsichtig unter Durchleuchtung bis ca. 2-4 cm vor die Pulmonalklappe vorgeschoben. Messungen und Klassifikation der Insuffizienz und Stenose wurden nach den Richtlinien der Fachgesellschaften durchgeführt [75,76].

Zur Messung der Insuffizienz wurden Farbdoppler und Pulswellendoppler verwendet. Die Insuffizienz wurde in die Grade 0-3 (0 = keine Insuffizienz, 1 = milde Insuffizienz, 2 = moderate Insuffizienz, 3 = schwere Insuffizienz) klassifiziert. Ein Rückfluss-Jet mit einer Länge < 10 mm, schmalem Ursprung, schwachem CW-Signal sowie langsamer Geschwindigkeitsabnahme wurde als Grad 1 kodiert. Ein kräftiges CW-Signal mit deutlicher Geschwindigkeitsabnahme und einer „pressure-half-time“ < 100 ms wurde als Grad 3 klassifiziert.

Die Vena contracta Methode wurde genutzt um die Insuffizienz als kontinuierliche Variable zu messen [77]. Sie wurde zur prozentualen Bewertung auf den inneren Durchmesser des tissue-engineerten Konduits bezogen.

Der Druckgradient über der Pulmonalklappe wurde anhand der in der Echokardiographie bestimmten Fluss-Geschwindigkeits-Kurve mittels der vereinfachten Bernoulli Formel berechnet [78].

Weiterhin wurde mittels der Echokardiographie die Funktion der Trikuspidalklappe mitbeurteilt und es wurde überprüft, ob ein Perikarderguss vorlag.

2.6.7. Angiographie

Die Angiographie erfolgte unter monoplaner Durchleuchtung mit dem C-Bogen (BV Pulsera, Phillips Healthcare, Eindhoven, Niederlande) in Kontrastmittelaufnahme (Kontrastmittel: Iopromid, Ultravist® 370, Bayer, Leverkusen, Deutschland) mit Hilfe eines Hochdruckinjektors (Angiomat 6000, Liebel Flarsheim, Ohio, USA). Zur Auswertung wurde das Programm Osirix (Osirix Imaging Software, Los Angeles, USA) verwendet. Die Messwerte dieser Methode wurden anhand eines bei Einleitung mit der Magensonde in den Oesophagus eingebrachten Kalibrierungskatheters (Cook Medical, Bloomington, USA) berechnet.

Sowohl in der Systole als auch in der Diastole wurden die Durchmesser des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (RVOT), der Klappe, des Bulbus, des supra-avalvulären Durchmessers sowie des Durchmessers 2 cm distal der Klappe bestimmt. Der Stentdurchmesser wurde am proximalen und distalen Ende sowie am Mittelpunkt ebenfalls in Systole und Diastole gemessen.

Ergänzend zu den ICE-Untersuchungen wurde auch über die Angiographie qualitativ die Suffizienz der Klappe beurteilt.

Die Angiographie diente darüber hinaus der Darstellung des Implantationsgebietes zur räumlichen Orientierung bei der Positionierung des Klappenstents während der Implantationsprozedur.

2.6.8. Invasive Druckmessung

Die Messung des systemischen Blutdrucks erfolgte kontinuierlich invasiv über den Zugang in der Arteria femoralis.

Im Zuge der Angiographie wurden darüber hinaus die Drücke in Pulmonalarterie, rechtem Ventrikel, rechtem Vorhof und der zentrale Venendruck über einen 5 Fr Pigtailkatheter (Cordis, Miami, USA) am Monitor (Eagle 4000, Marquette Hellige, Freiburg, Deutschland) erfasst. Anhand der Druckwerte aus dem rechten Ventrikel und der Pulmonalarterie wurde der transvalvuläre Gradient errechnet.

2.6.9. Explantation

Die Schafe wurden mittels Propofolbolus und Kaliumchlorid getötet.

Der Thorax der Tiere wurde nach Feststellung des Todes eröffnet und das Herz an den großen Gefäßen abgetrennt und mitsamt dem Perikard entnommen.

Anschließend erfolgte die fachgerechte Entsorgung des Tierkadavers.

2.7. Makroskopische Untersuchung

Nach Entnahme des Herzens wurde das Perikard auf Ergussbildung untersucht und nachfolgend entfernt. Das Herz wurde von außen auf Verletzungen, Infektionszeichen und Nekrosen inspiziert.

Fotoaufnahmen von allen begutachteten Strukturen wurden für nachträgliche Beurteilungen auf einer größenskalierten Unterlage angefertigt.

Die Abgrenzungen des Stents wurden von außerhalb des Herzens untersucht und es wurde nach Penetrationen von einzelnen Stentstreben durch das Gewebe gesucht.

Nachfolgend wurden zur Begutachtung der Herzbinnenräume der rechte und der linke Ventrikel eröffnet.

Die Klappenmorphologie wurde vom rechten Ventrikel und der Pulmonalarterie aus beurteilt und fotografisch dokumentiert, bevor die Pulmonalarterie mitsamt Stent vom Rest des Herzens abgetrennt und zwischen dem rechtslateralen und linkslateralen Segel entlang seiner Längsachse aufgeschnitten wurde.

Am aufgeklappten Stent wurde die Klappenmorphologie weitergehend mit besonderem Augenmerk auf Vegetationen und Thrombenbildung untersucht. Weiterhin wurde beurteilt ob ventrikel- oder pulmonalarterienseitig Brüche von Stentstreben vorlagen.

Abschließend wurde das Gewebewachstum vom Konduit auf das native Gewebe inspiziert.

2.8. Histologie

Für die histologische Aufarbeitung wurde das am nächsten zur Aorta gelegene Segel verwendet. Nach der makroskopischen Analyse und dem Zuschneiden des Segels wurde dieses in gepuffertem Formaldehyd 4% (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) fixiert.

Um ein Herauslösen der Stentanteile mit einer unvermeidlichen Beschädigung der Grenzfläche zwischen nativem Gewebe und tissue-engineerter Klappe zu vermeiden, wurde die sog. „Trenn-Dünnschliff-Technik“ zur Herstellung der histologischen Präparate angewendet [79]. Nach Einbettung der Präparate in Kunstharz (Methylmethacrylat, Technovit 9100, Kulzer & Co, Wehrheim, Deutschland) wurden Schnitte von 200µm Stärke mittels einer Diamantbandsäge angefertigt (300CP, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die zur lichtmikroskopischen Untersuchung erforderlichen Semidünnschnitte mit einer Stärke von 20µm wurden

mit Hilfe eines Mikroschleifsystems (400CS, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) hergestellt.

Für die Standardfärbung wurde Richardson-Blue verwendet. Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern wurden nach Aufbringen der Gewebeschnitte auf Glas und Deplastifizierung [80] unter Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt (Tabelle 1). Nach dem gleichen Prinzip wurden eine Movat-Pentachrom-Färbung (Färbung zur Identifizierung der Komponenten der extrazellulären Matrix, Bewertung in Tabelle 2) und bei drei repräsentativen Präparaten (je eines pro Follow-up Gruppe) eine von-Kossa-Färbung (Kalkfärbung) angefertigt.

Die histologische Auswertung erfolgte mittels Lichtmikroskop (Leica DM LB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Darüber hinaus erfolgte eine digitale Erfassung der Präparate für die virtuelle Mikroskopie mit dem Scanning Mikroskop (Olympus BX51, Dotslide-System, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland). Die digitale Bildspeicherung erfolgte mit der Software OlyVia (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland).

Zum Vergleich mit den Klappen der verschiedenen Follow-up-Gruppen bezüglich ihrer Matrixkonfiguration und des Gewebeumbaus wurde eine im Bioreaktor kultivierte, dezellularisierte, aber nicht implantierte dTE-Klappe herangezogen.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Primärer Antikörper	Verdünnung	Antigenentfernung	Sekundärer Antikörper	Ziel
Monoklonaler Mausantikörper gegen humanes glattmuskuläres Aktin (SMA), Klon 1A4 (Dako)	1:50	Zitrat Puffer, pH 6, 40 min	Kaninchen anti Maus Immunoglobulin (Dako), Verdünnung 1:100	Myofibroblasten
Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanen von Willebrand Faktor (Dako)	1:400	Zitrat Puffer, pH 6, 40 min	Schweine anti Kaninchen Immunoglobulin (Dako), Verdünnung 1:100	Endothelzellen
Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes CD3 (Dako)	1:100	Zitrat Puffer, pH 6, 40 min	Polyklonale Kaninchen anti Ziege Immunoglobuline/ Meerrettich Peroxidase (Dako), Verdünnung 1:100	T-Lymphozyten
Monoklonaler Mausantikörper gegen humanes CD79αcy, Klon HM57 (Dako)	1:100	Tris/EDTA, pH 9, 20 min	Kaninchen anti Maus Immunoglobulin (Dako), Verdünnung 1:100	B-Lymphozyten

Tabelle 2: Färbecharakteristika der Movat Pentachrom Färbung

Farbe	Struktur
Schwarz	Zellkerne, elastische Fasern
Blau	Glykoproteine, extrazelluläre Matrix
Gelb	Kollagen, retikuläre Fasern
Rot	Fibrin (hell), Muskelzellen (dunkel)

2.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA) und SPSS 21.0 (IBM Corporation, USA).

Die Daten wurden anhand von Schiefe (Cut-off Werte <-1 und >1) und Histogramm auf Normalverteilung untersucht.

Normalverteilte Variablen sind dargestellt als Mittelwerte (+/- Standardabweichung), nicht normalverteilte als Median (Interquartilabstand). Mittelwertvergleiche für normalverteilte Variablen wurden mittels T-Test durchgeführt. Für nicht

normalverteilte Variablen wurden der Wilcoxon-Rangsummentest bei abhängigen Variablen und der Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Variablen verwendet. Korrelationen wurden für nicht normalverteilte Variablen nach der Spearman-Rho Korrelation berechnet.

Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. P-Werte von $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakteristika der Tiere vor Implantation

Die Tiere hatten bei Einstellung ein mittleres Gewicht von $43,8 \pm 5,77$ kg und wiesen eine mittlere Widerristhöhe von $64,73 \pm 4,68$ cm auf. Bis zur Implantation nahm das mittlere Gewicht auf $47,3 \pm 5,9$ kg zu.

Die CT-Messungen vor Implantation ergaben einen mittleren diastolischen Durchmesser der Pulmonalklappe von 23,77 mm. Die Spannweite der Werte betrug 17,7 mm bis 29,7 mm (Tabelle 3).

Tabelle 3: CT-Messungen der nativen Durchmesser. Durchmesser an verschiedenen anatomischen Positionen des rechten Herzens und der Pulmonalstrombahn der Versuchstiere in der Diastole.

Gemittelter diastolischer Durchmesser in mm	N	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Rechtsventrikulärer Ausflusstrakt	14	25,43	4,85	17,9	32,9
Pulmonalklappe	14	23,77	3,19	17,7	29,7
Bulbus	14	27,87	1,89	23,9	30,4
Supra-avalvulär	14	24,63	1,94	21,9	28,7
2 cm distal der Pulmonalklappe	14	25,06	1,61	22,8	28,6
Untersuchte Tiere	14 ¹³				

Die Widerristhöhe der Tiere lieferte dabei einen signifikanten nicht invasiv bestimmten Prognoseparameter für den diastolischen Pulmonalklappendurchmesser (Abbildung 7).

¹³ Bei Tier Nummer 11B1 wurde auf Grund des schlechten Gesundheitszustands zum Zeitpunkt der geplanten Untersuchung kein CT vor Implantation durchgeführt.

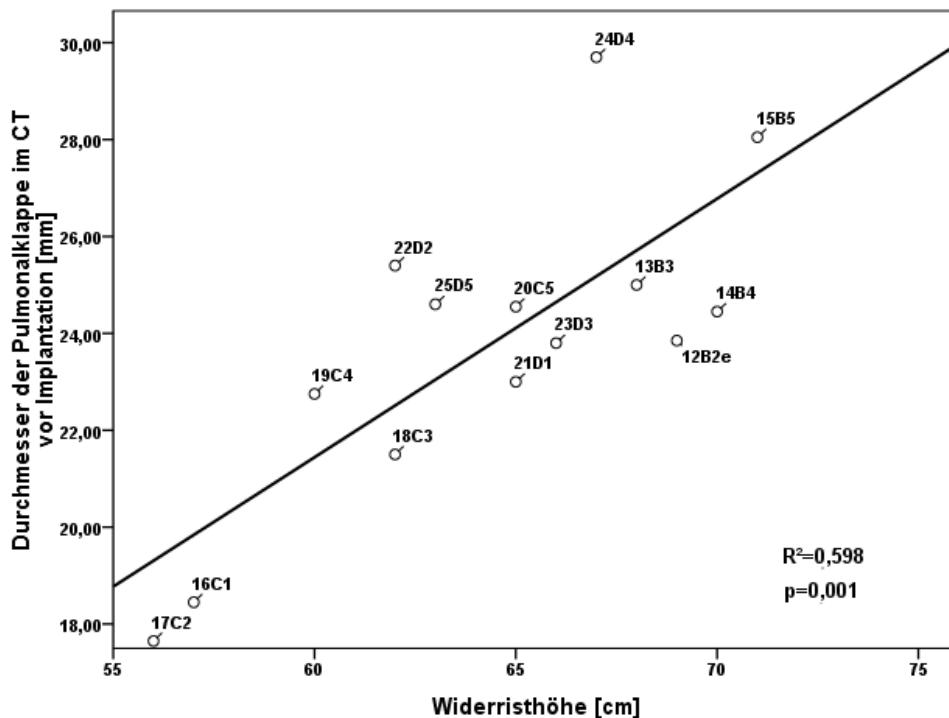


Abbildung 7: Zusammenhang zwischen der Widerristhöhe und dem diastolischen Durchmesser der Pulmonalklappe. Es zeigt sich ein starker Zusammenhang ($R^2=0,598$) zwischen den beiden Parametern.

Von Einstellung bis Implantation vergingen im Minimum 1,57 Wochen.

3.2. *Verwendete Materialien und Crimping*

Vor der Implantation wiesen die Klappen makroskopisch eine homogene Struktur auf und ließen keine Löcher oder Verdickungen erkennen. Bei einigen Klappen waren entlang der Lunulae, vor allem mittig im Bereich des Zusammentreffens der Segel, Zonen mit ausgebliebener Verdickung zu erkennen (Abbildung 8).

Die Koaptationszone der Segel war von Beginn an gering. Die Aufhängungen der Segel an der Wand lagen nur geringfügig höher als der Punkt des zentralen Zusammentreffens aller Segel. Die Entwicklung einer bauchigen Form der Klappensegel mit Ausbildung eines Sinus dahinter war nach der Phase im Bioreaktor kaum zu erkennen.

Nach manuellem Aufschneiden der Segel ergab sich eine leichte Spaltbildung zwischen diesen. Teilweise standen die Segel aufgefächert, legten sich aber bei leichtem Druck durch Eintauchen in Flüssigkeit gut wieder aneinander.

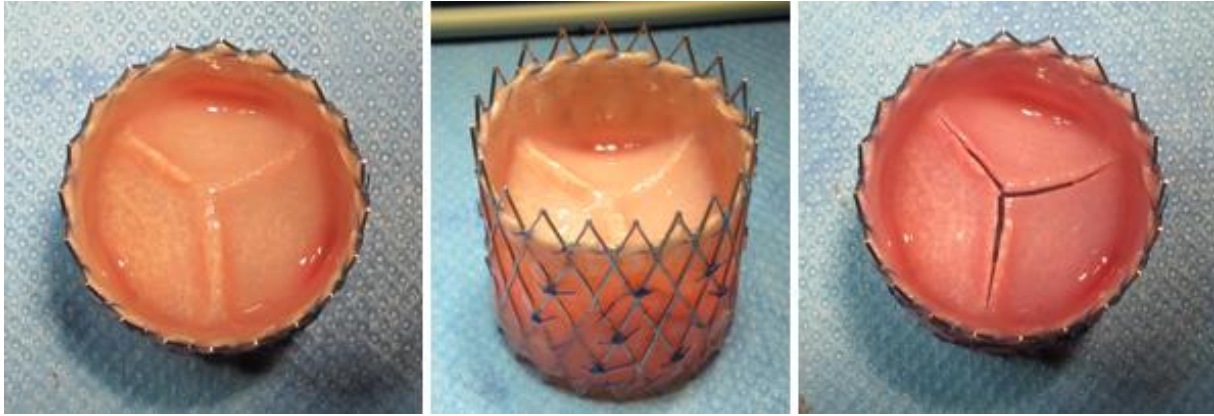


Abbildung 8 : Aussehen der Klappe vor Implantation. Bild 1: Ansicht von oben vor dem Aufschneiden der Segel; Bild 2: leicht seitliche Ansicht; Bild 3: Ansicht von oben nach dem Aufschneiden der Segel entlang der Lunulae. Bild 1 zeigt die nicht bis ganz zur Mitte durchgehende Verdickung an der Lunula. Die laterale Ansicht lässt die nur mäßig vorhandene Koaptationszone erahnen (Bild 2). Nach dem Aufschneiden der Segelverwachsungen ergab sich eine leichte Spaltbildung zwischen den einzelnen Segeln (Bild 3).

Das Crimping erfolgte unmittelbar vor der Implantation. In n=3 Fällen¹⁴ wurde nach dieser Prozedur ein Bruch des Stents am distalen Ende beobachtet. Auf Grund mangelnder Ersatzklappen und der geringen Auswirkung dieses Stentanteils auf die Radialkraft des Stents im Allgemeinen wurden diese Klappenstents dennoch implantiert.

Zur Implantation wurde bei n=10 Schafen (67%) die 8 mm Kapsel verwendet, bei den verbleibenden n=5 Schafen (33%) die 10 mm Kapsel.

Die verwendete Katheterspitze wurde im Verlauf des Versuches auf Grund von Komplikationen (s.u.) modifiziert und rückseitig angeschrägt, um ihr eine atraumatische Form zu verleihen.

3.3. Erfolg und Komplikationen bei der Implantation

Die Implantation der Herzklappenstents konnte bei allen Tieren erfolgreich durchgeführt werden (Abbildung 9). Während des Eingriffes blieben die Tiere hämodynamisch stabil und hatten mit wenigen Ausnahmen physiologische Werte in den seriell über den Eingriff durchgeführten Blutgasanalysen.

¹⁴ Tiere Nummer 13B3,19C4 und 22D2

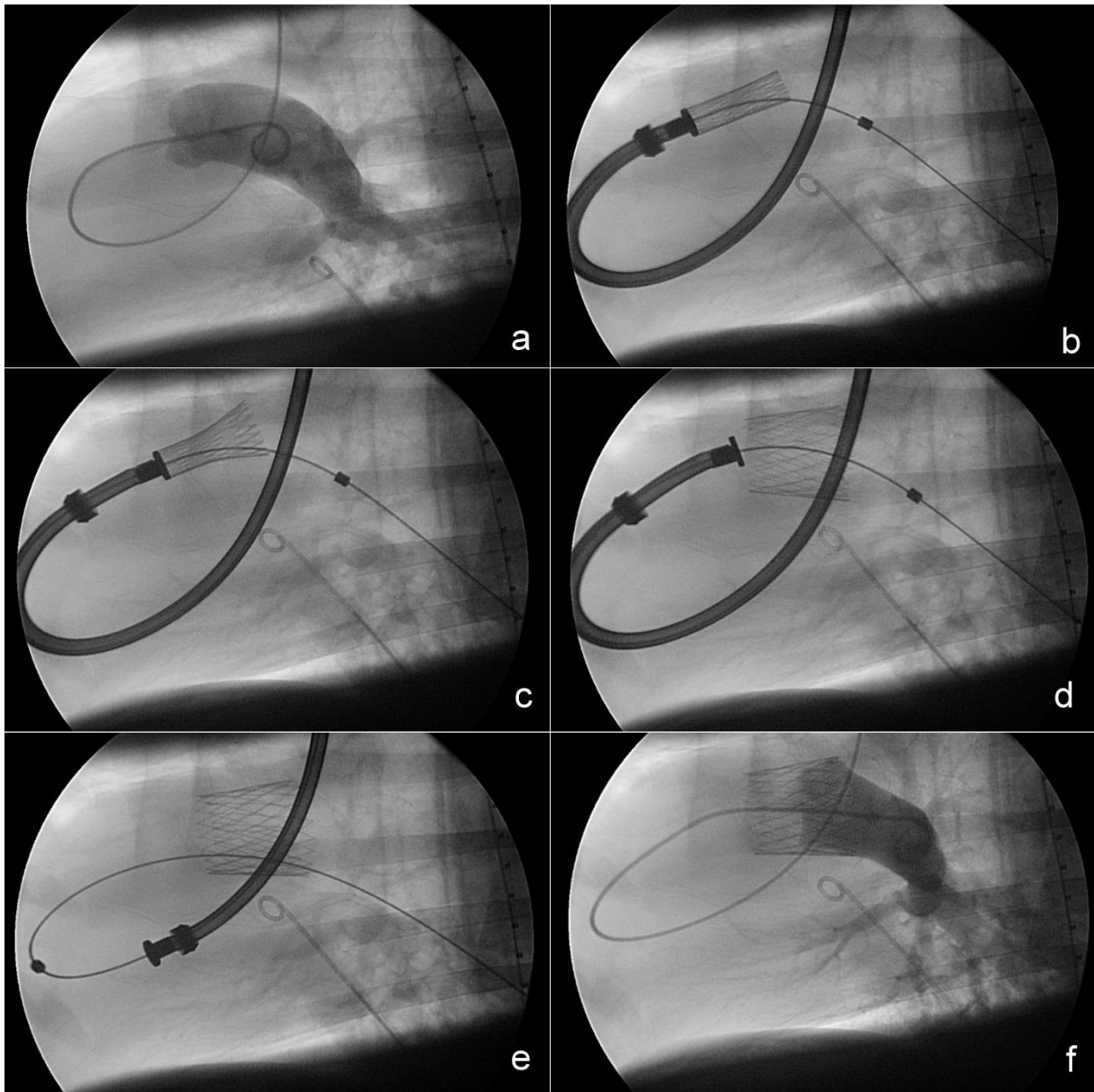


Abbildung 9: Ablauf der Implantation. (a) Sichtbarmachung der nativen Strukturen mit Kontrastmittel um das Implantationsgebiet darzustellen und die Position für die einzusetzende Klappe zu bestimmen, (b) Einführen des Implantationskatheters, (c) Freisetzung des Stents beginnend am distalen Ende, (d) Komplette Freisetzung des Stents aus dem Katheter in Pulmonalklappenposition, (e) Zurückführen des Implantationskatheters, (f) Angiografische Kontrolle der Funktion und Positionierung der neu eingesetzten Klappe

Bei Einführung des Implantationskatheters ergaben sich bei den meisten Tieren ventrikuläre Extrasystolen, die aber unmittelbar nach Entfernen des Katheters wieder verschwanden und hämodynamisch irrelevant waren.

Bei mehreren Tieren kam es zu einem Verhaken der Spitze des Ablagesystems in der abgelegten dTE-Klappe. Bei Tier 11B1 verursachte dies beim Zurückziehen des Ablagesystems das Einreißen eines Segels. Das Segel schlug nachfolgend diastolisch in den rechten Ventrikel zurück. Nach den ersten sechs Implantationen

wurde die Spitze durch rückseitige Anchrägung modifiziert. In den neun mit modifizierter Spitze vorgenommenen Implantationen trat nur ein einziges Mal ein leichtes Verhaken auf. In diesem Fall konnte durch vorsichtiges Vor- und Zurückschieben des Ablagesystems eine Lösung der Verhakung ohne Komplikationen erreicht werden.

Bei drei Tieren löste sich im Rahmen des Implantationsvorgangs die Kapsel des Ablagesystems vom Schlauch. Bei Tier 24D4 erforderte die komplette Ablösung der Kapsel eine Bergung dieser mitsamt des noch in ihr befindlichen Stents. Aus Mangel an Ersatzklappen wurde der Klappenstent erneut gecrimpt und im 2. Versuch implantiert. Nachfolgend war ein Segel der Klappe mehrfach geknickt.

Die Ablage des Klappenstents über der nativen Pulmonalklappe mit komplettem Ausschluss der nativen Pulmonalklappe vom Blutstrom wurde in 13 von 15 Fällen (87%) erzielt. In den zwei verbliebenen Fällen erfolgte die Positionierung der Stents zu weit distal in der Pulmonalarterie. Bei Tier 13C3 blieb die native Pulmonalklappe voll funktionstüchtig („Doppelklappe“). In den Funktionsuntersuchungen zeigte sich anschließend ein Schluss der nativen Klappe, nicht aber der dTE-Klappe. Im Laufe des Follow-ups verwuchsen bei Tier 13C3 die dTE-Klappensegel vollständig mit der Wand des Konduits. Bei Tier 21D1 wurde lediglich eines der drei nativen Segel nicht überstentet. Hier blieb die leichte Fehlpositionierung ohne größere hämodynamische Folgen.

In einigen Fällen hatte sich der Stent fest in die Kapsel des Ablagesystems gepresst. Dies trat vor allem bei Verwendung der kleineren 8 mm Kapsel auf, wenn die Knoten, mit denen das Konduit am Stent vernäht war, sehr gleichmäßig auf einer Ebene lagen. In diesem Fall war der Durchmesser des Stents an dieser Stelle etwas vergrößert. (Abbildung 10). Subjektiv war das Ausschieben des Stents in diesen Fällen mit mehr Kraftaufwand verbunden und geschah abrupter.

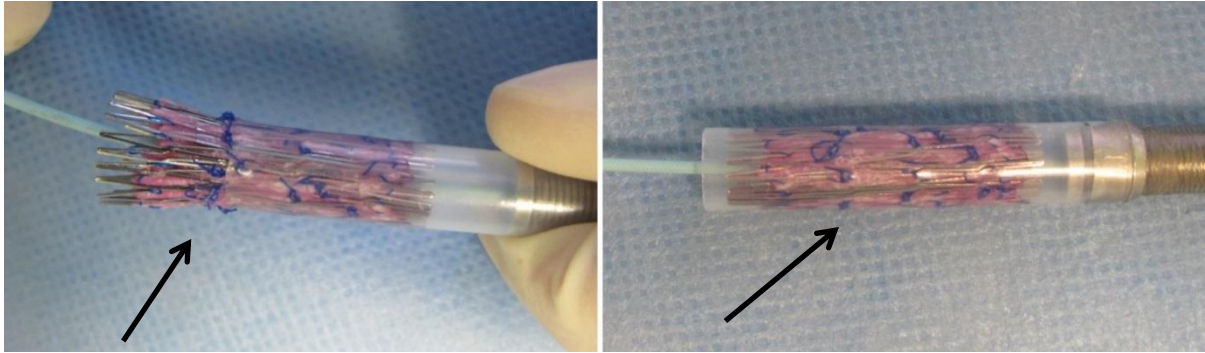


Abbildung 10: Beladungsvorgang der Kapsel mit dem Klappenstent und vollständig beladene Kapsel. Liegen viele Knoten zur Befestigung des Klappenkonduits am Stent auf einer Ebene (Pfeile) pressten sie sich stark in das Material der Kapsel. Das Ausschieben des Stents wurde dadurch subjektiv erschwert.

Nach Ablage des Stents und den nachfolgenden Untersuchungen konnten alle Tiere erfolgreich erweckt werden. Die mittlere Dauer des Eingriffes von Einleitung des Tieres bis zur Extubation lag bei $7,18 \pm 1,82$ Stunden. Die Durchleuchtungszeit während des Eingriffes lag im Mittel bei $20:05 \pm 7:43$ min.

3.4. Funktion der Klappen direkt nach der Implantation

3.4.1. Ausschluss von Tieren von der Analyse

Die beschriebene Doppelklappe machte eine weitergehende Beurteilung der Klappenfunktion bei Tier 13B3 widersinnig. Das Tier wurde von allen weiteren Funktionsanalysen ausgeschlossen.

Alle Prozentangaben beziehen sich auf die in die jeweilige Analyse eingeschlossenen Tiere.

3.4.2. Intrakardiale Echokardiographie

3.4.2.1. Insuffizienz

Unmittelbar nach Implantation konnte bei vier Tieren ein vollständig suffizienter Schluss der Klappe beobachtet werden. Je vier weitere Tiere lagen im Bereich der milden und moderaten Insuffizienz. Zwei Tiere zeigten eine schwere Insuffizienz (Abbildung 11).

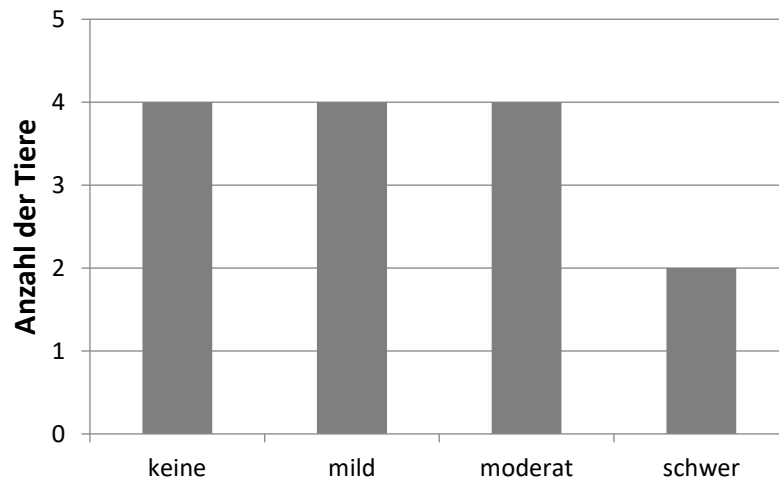


Abbildung 11: Insuffizienzgrad der Klappen unmittelbar nach Implantation.

Eine schwere Insuffizienz lag bei Tier 11B1 vor, bei dem ein Segel während der Implantation verletzt worden war und nachfolgend zurückschlug. Tier 24D4, bei welchem die dTE-Klappe ein zweites Mal gecrimpt und trotz eines genickten Segels implantiert wurde, zeigte eine moderate Insuffizienz.

Eine detaillierte Übersicht zu den einzelnen Tieren zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Übersicht zu Insuffizienzgrad und besonderen Anmerkungen zu den einzelnen Tieren

Tier	Follow-up Gruppe [Wochen]	Besondere Anmerkung	Insuffizienzgrad nach Implantation
11B1	24	- Klappe bei Implantation durch Verhaken des Ablagesystems stark beschädigt, ein Segel schlägt komplett zurück - kein CT vor Implantation durchgeführt	3
12B2	8		1
13B3	16	- Klappe in Pulmonalarterie implantiert. Die native Klappe ist komplett nicht überstentet („Doppelklappe“) - Nach Schluss der nativen Klappe schließt die dTE-Klappe nicht mehr. Segel stehen kontinuierlich offen. - Stentbruch vor Implantation	?
14B4	16		1
15B5	24	- Tier hatte direkt nach Implantation einen stark verformten, oval aussehenden Stent (s.u.). Die Segel schlugen auf ungleiche Höhe zurück	3
16C1	24		1
17C2	24		0
18C3	8		0
19C4	16	- Stentbruch vor Implantation	0
20C5	16		0
21D1	8	- Klappe in Pulmonalarterie implantiert. Ein natives Segel ist noch frei beweglich	2
22D2	8	- Stentbruch vor Implantation	2
23D3	24		1
24D4	16	- Kapsel bei Implantation abgerissen. Nach der Bergung und erneuter Implantation ist ein Segel mehrfach geknickt und die Spitze schlägt um	2
25D5	8		2

3.4.2.2. Echokardiografische Druckmessungen

Sowohl der maximale und mittlere Druckgradient über der Pulmonalklappe als auch die maximale Flussgeschwindigkeit war nach Implantation geringfügig höher als die Ausgangswerte der nativen Klappen. Diese Differenz zeigte jedoch keine Signifikanz (Tabelle 5). Die nach der Implantation gemessenen Werte lagen zudem im physiologischen Bereich.

Tabelle 5: Vergleich der echokardiografisch bestimmten Stenoseparameter vor und nach der Implantation.

	vor Implantation	nach Implantation	P-Wert
Max. PG [mmHg]	3,0 (1,8)	3,9 (0,3)	0,139
Mean PG [mmHg]	1,4 (0,8)	1,8 (1,6)	0,110
Vmax [m/s]	0,9 (0,3)	1,0 (0,4)	0,139

Die Variablen sind als Median (Interquartilabstand) dargestellt. P-Werte wurden nach Wilcoxon-Rangsummen-Test bestimmt. Max PG = maximaler Druckgradient über der Pulmonalklappe, Mean PG = mittlerer systolischer Gradient über der Pulmonalklappe, Vmax = maximale systolische Flussgeschwindigkeit über der Pulmonalklappe

3.4.3. Invasive Druckmessung

Entsprechend den Ergebnissen in der echokardiografischen Druckmessung, konnte auch in der invasiven Druckmessung kein Anhalt für eine Stenose gefunden werden. Der systolische Druckgradient fiel vor der Implantation ($6,7 \pm 2,7$ mmHg) sogar geringfügig höher aus als nach der Implantation ($6,5 \pm 2,3$ mmHg), ($p=0,937$).

3.5. Follow-up

3.5.1. Einhaltung der Follow-up-Zeitpunkte

Alle Tiere überlebten den für sie geplanten Nachbeobachtungszeitraum. Die einzelnen Gruppen hatten eine mittlere Nachbeobachtungszeit von $8,4 \pm 0,5$ Wochen, $16,0 \pm 0,0$ Wochen und $24,0 \pm 0,0$ Wochen.

Die Zeitpunkte der Zwischenuntersuchungen mittels intrakardialer Echokardiographie konnten ebenfalls in der Regel eingehalten werden. Bei einzelnen Tieren konnten Untersuchungen wegen Krankheit zum vorgesehenen Zeitpunkt nicht durchgeführt werden (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zeitpunkte der Untersuchungen mittels intrakardialer Echokardiographie

ICE-Untersuchung	A	B	C	D	E	F	G
Zeitraum nach Implantation [Wochen]	0 \pm 0,0	4,2 \pm 0,7	8,0 \pm 0,9	11,5 \pm 1,1	16,0 \pm 0,7	20,2 \pm 1,0	24,0 \pm 0,0
Anzahl der untersuchten Tiere	15	13	14	10	10	5	5
A = Implantationszeitpunkt, B= 4 Wochen, C= 8 Wochen, D= 12 Wochen, E= 16 Wochen, F= 20 Wochen, G= 24 Wochen							

CT Untersuchungen wurden im Mittel $1,5 \pm 0,4$ Wochen nach Implantation und $1,3 \pm 0,7$ Wochen vor Explantation durchgeführt.

3.5.2. CT-Untersuchungen

Bei einem Großteil der Stents zeigte sich im CT nach Implantation eine ovale Form. Im Mittel bestand eine Differenz zwischen minimalem und maximalem Durchmesser des Stents (diastolisch) in mittlerer Position von $3,9 \pm 2,75 \text{ mm}$.

Die Differenz zwischen minimalem und maximalem Durchmesser des Stents (diastolisch) korrelierte signifikant mit dem Insuffizienzgrad der Klappen nach Implantation (Korrelationskoeffizient nach Spearman Rho 0,632; $p=0,027$) (Abbildung 12).

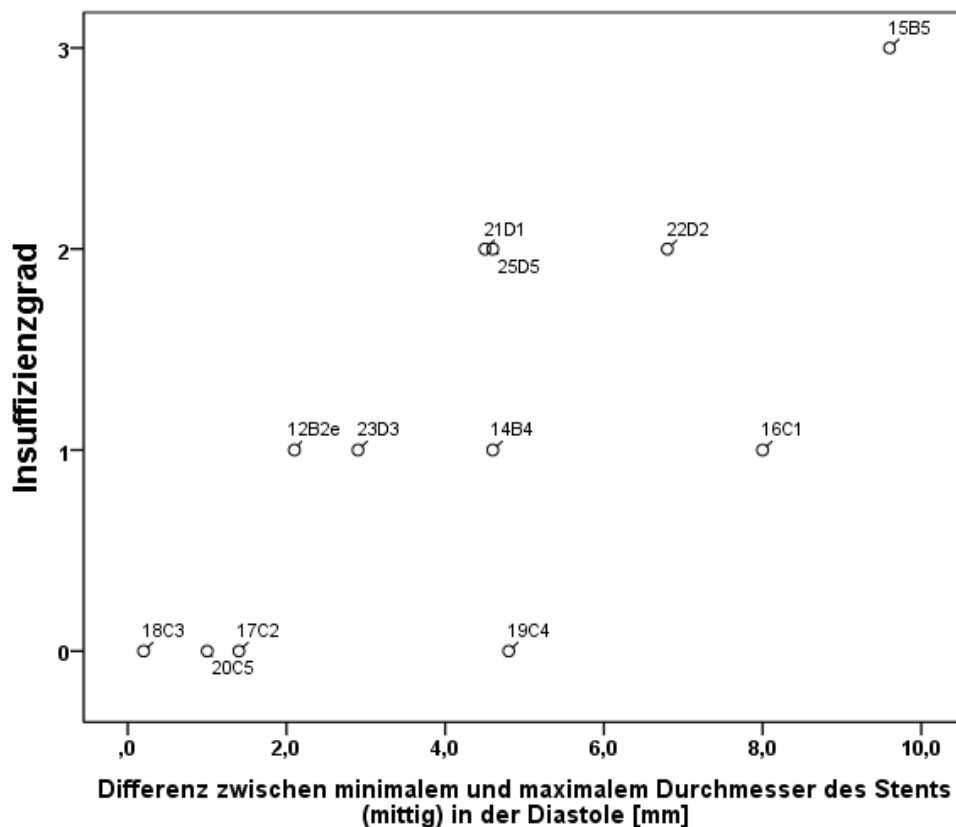


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen der Ovalität des Stents und dem Insuffizienzgrad der Klappe nach Implantation. Tiere 11, 13 und 24 wurden wegen anderer offensichtlich die Insuffizienz bedingender Gründe von der Analyse ausgeschlossen. Die drei Klappen, welche die geringste Ovalität aufweisen sind vollkommen suffizient. Im Gegenteil dazu ist die Klappe von Tier 15 bei einem beträchtlich oval verformten Stent maximal insuffizient.

Die drei Klappen mit einer Differenz zwischen minimalem und maximalem Durchmesser des Stents (diastolisch) kleiner als 1,5 mm (Tiere 17C2, 18C3 und 20C5) waren allesamt suffizient. Die Differenz bei den moderat insuffizienten Klappen war deutlich größer. Das Tier (15B5) mit der größten Differenz (9,6 mm)

zeigte als einziges unter den in diese Analyse eingeschlossenen Tieren eine schwere Klappeninsuffizienz.

Bis zum CT vor Explantation nahm der Stent eine zunehmend rundere Form ein. Die mittlere Differenz nahm signifikant um $1,5 \pm 2,60$ mm auf $2,5 \pm 1,87$ mm ab ($p=0,05$). Ob sich dies verbessernd auf die Insuffizienz der Klappe auswirkte, war auf Grund anderer die Insuffizienz zu diesem Zeitpunkt bestimmender Einflüsse (s.u.) nicht zu analysieren.

Bis zum CT nach Implantation hatte sich der Stent in mittlerer Position auf im Mittel $27,3 \pm 1,56$ cm aufgeweitet. Bis zum CT vor Explantation erfolgte keine weitere signifikante Zunahme des Stentdurchmessers. (Tabelle 7).

Tabelle 7: CT-Messungen zur Entwicklung des mittleren Stentdurchmessers.

	CT2	CT3	P-Wert
Stent proximal	27,8±1,75	28,0±1,25	0,598
Stent mittig	27,3±1,56	27,7±1,04	0,123
Stent distal	26,8±1,71	27,4±1,92	0,152

Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. CT2 = CT nach Implantation, CT3 = CT vor Explantation, Signifikanzberechnung durch T-Test für verbundene Stichproben

3.5.3. Entwicklung der Klappenfunktion

3.5.3.1. Intrakardiale Echokardiographie (Insuffizienz)

Die Insuffizienz der Klappen nahm bei allen Tieren im Verlauf des Follow-ups zu. Zum Ende des Follow-ups bestand unabhängig von der Follow-up Gruppe bei allen Klappen eine moderate ($n=6$; 43%) oder schwere ($n=8$; 57%) Insuffizienz.

Der Anteil der schwer insuffizienten Klappen nahm zu Kosten des Anteils der mild und moderat insuffizienten Klappen mit zunehmender Follow-up Dauer schrittweise zu (Abbildung 13).

Die zu Beginn suffizienten Klappen der vier Tiere mit den Nummern 17-20 verschlechterten sich unabhängig von der Follow-up Gruppe bis zu einer moderaten Insuffizienz.

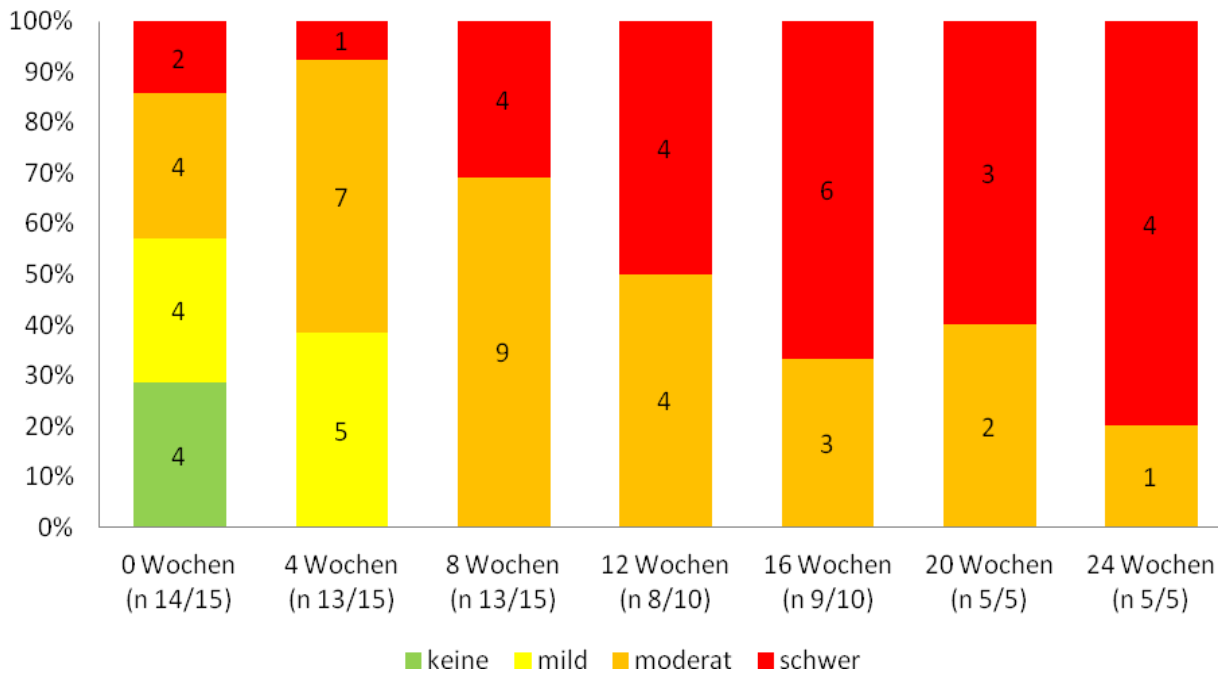


Abbildung 13: Insuffizienzgrad der Klappen im Verlauf. Die auf der unterhalb der Wochenangabe auf der X-Achse dargestellte Beschriftung stellt die Zahl der Untersuchten Tiere im Bezug zu den zu diesem Zeitpunkt noch im Versuch befindlichen Tieren dar. Das Ausmaß der Klappeninsuffizienz stieg über das Follow-up hinweg zunehmend an.

Die Vena contracta Methode ergab direkt nach Implantation eine mediane Insuffizienz der Klappen von 15%. Nach 8 Wochen entwickelte sich ein medianer Anstieg auf 29%. Nach 16 Wochen waren es 48% und bis zum längsten Follow-up Zeitpunkt nach 24 Wochen 68% (Abbildung 14).

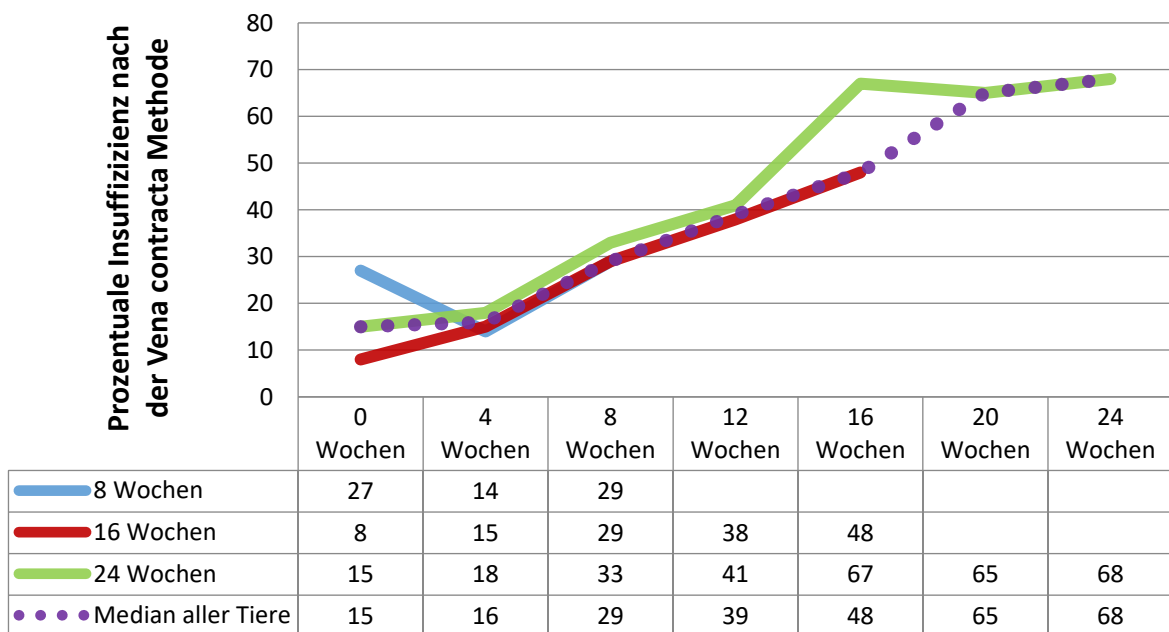


Abbildung 14: Insuffizienz der Klappen nach der Vena contracta Methode im Verlauf. Die Tabelle stellt Medianwerte dar. Die drei Follow-up Gruppen sowie die Gesamtheit aller Klappen sind jeweils durch eine Linie repräsentiert.

3.5.3.2 Echokardiografische Druckmessungen

Nach Implantation, sowie nach Woche 4, 8, 12, 16 und 24 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des maximalen und mittleren Druckes sowie der Flussgeschwindigkeit über der Klappe im Vergleich zur nativen Klappe vor Implantation (Tabelle 8). Bei Woche 20 zeigte sich eine signifikante Zunahme des medianen maximalen Druckgradienten über der Klappe im Vergleich zur Nativklappe auf 4,3 (3,6) mmHg ($p=0,043$). Sowohl der mediane maximale Druckgradient als auch die einzelnen Werte aller Tiere zu diesem Zeitpunkt befanden sich hierbei jedoch im klinischen Normalbereich.

Tabelle 8: Echokardiografisch bestimmte Stenoseparameter im Verlauf

	Prä imp. (n = 14)	0 W. (n = 14)	4 W. (n = 13)	8 W. (n = 13)	12 W. (n = 8)	16 W. (n = 9)	20 W. (n = 5)	24 W. (n = 5)
Max PG	3,0 (1,8) ^{ns}	3,9 (3,1) ^{ns}	3,1 (2,9) ^{ns}	3,4 (4,0) ^{ns}	3,5 (2,2) ^{ns}	3,8 (3,8) ^{ns}	4,3 (3,6) [*]	2,5 (5,2) ^{ns}
Mean PG	1,4 (0,8) ^{ns}	1,8 (1,6) ^{ns}	1,5 (1,2) ^{ns}	1,5 (1,5) ^{ns}	1,8 (1,2) ^{ns}	1,7 (1,7) ^{ns}	1,9 (1,6) ^{ns}	1,2 (2,3) ^{ns}
Vmax	0,9 (0,3) ^{ns}	1,0 (0,4) ^{ns}	0,9 (0,4) ^{ns}	0,9 (0,5) ^{ns}	0,9 (0,3) ^{ns}	1,0 (0,5) ^{ns}	1,0 (0,4) ^{ns}	0,8 (0,7) ^{ns}

Werte dargestellt als Median (Interquartilabstand) der zu diesem Zeitpunkt im Versuch befindlichen Tiere. Prä Imp = vor Implantation, Max PG = maximaler Druckgradient über der Klappe in mmHg, Mean PG = mittlerer Druckgradient über der Klappe in mmHg, Vmax = maximale Flussgeschwindigkeit über der Klappe in m/s. Der Wilcoxon-Rangsummentest wurde zwischen den Werten der nativen Klappe und den jeweiligen Follow-up Zeitpunkten ausgeführt, ns = nicht signifikant, * = signifikant

3.5.3.3 Invasive Druckmessung

Es zeigte sich kein signifikanter Anstieg des invasiv gemessenen Druckgradienten über der Pulmonalklappe bis zur Explantation unabhängig von der Follow-up Gruppe (Abbildung 15). Auch im Vergleich der einzelnen Follow-up-Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

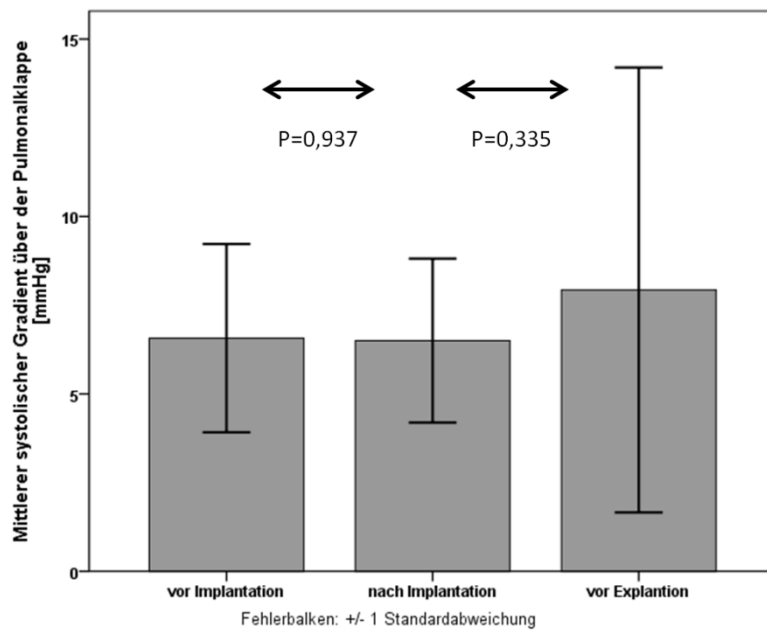


Abbildung 15: Invasiv gemessener systolischer Druckgradient im Verlauf.

3.6. Makroskopische Analyse

In der makroskopischen Untersuchung nach Explantation wurde die Position des Klappenstents im Verhältnis zur nativen Klappe beurteilt. Bei zwei Tieren konnte, entsprechend den Ergebnissen im ICE, eine Positionierung des Stents distal der nativen Klappe nachgewiesen werden.

Die Stents der verbleibenden 13 Tiere überdeckten die native Klappe vollkommen. Bei drei Tieren überdeckte der distale Teil des Stents die native Klappe, bei fünf Tieren der mittige und bei weiteren fünf der proximale Teil (Tabelle 9).

Bei allen Tieren ließ sich der Stent von außen deutlich durch das Gewebe der Pulmonalarterie abgrenzen. Der Stent weitete die zu diesem Zeitpunkt nicht mehr mit Blut gefüllte Pulmonalarterie deutlich auf. Am distalen Ende des Stents wurde bei drei Tieren eine Perforation von Stentstreben durch das pulmonalarterielle Gewebe festgestellt. Eine Perforation von Stentstreben am proximalen Ende des Stents wurde bei den beiden Tieren beobachtet, bei welchen der Stent oberhalb der nativen Klappe implantiert worden war (Abbildung 16, Tabelle 9).

Klappen, welche weiter ventrikelwärts implantiert wurden, zeigten keine Perforation.

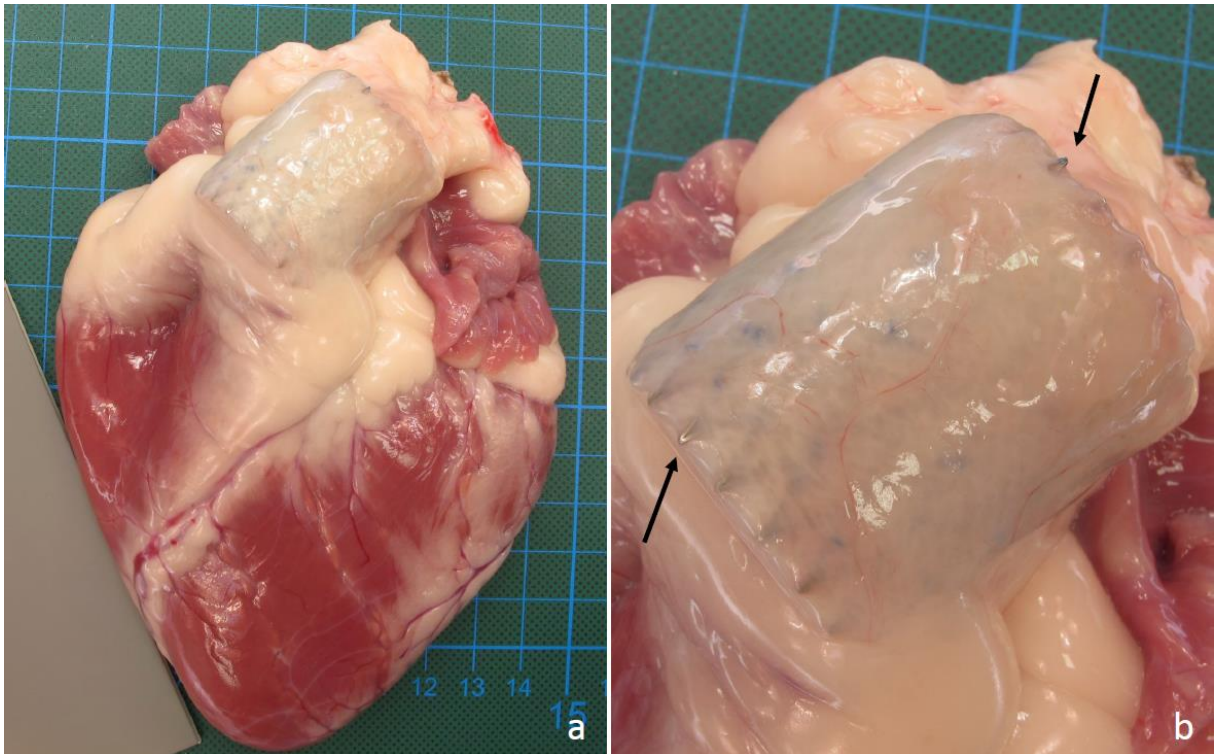


Abbildung 16: Makroskopische Ansicht des Herzens (Tier 21D1) bei Explantation (a) und Vergrößerung der Pulmonalklappenregion mit implantiertem Stent (b). Schon von außen zeichnete sich der Stentumriss deutlich ab. In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass je eine Stentstrebe distal und proximal perforiert (Pfeile).

Verletzungen durch die Intervention wurden bei drei Tieren beobachtet. Hierbei handelte es sich in zwei Fällen um Einblutungen am rechten Ventrikel, die vermutlich durch den ICE-Katheter hervorgerufen worden waren und in einem anderen Fall um ein eingerissenes Segel der Trikuspidalklappe, welches möglicherweise durch den Implantationskatheter verletzt wurde (Tabelle 9).

Weiterhin fielen zwei Herzen durch diffus verteilte Einblutungen im Sinne einer Perikarditis auf. Ein anderes Herz zeigte braun-grüne Veränderungen an der Außenseite der Pulmonalarterie, und dem angrenzenden Perikard.

Nach dem Auftrennen des Stents zeigten sich in fünf Fällen Brüche von Stentstreben. Diese waren sowohl pulmonalarterien- wie auch ventrikelseitig zu beobachten (Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht makroskopischer Ergebnisse

Untersuchungsgegenstand	Anzahl der Tiere
Stentposition	
0	2
1	5
2	5
3	3
Perforation von Stentstreben	
Proximal	2
Distal	3
Verletzungen durch die Intervention	
Einblutungen am rechten Ventrikel	2
Eingerissene Trikuspidalklappe	1
Bruch von Stentstreben	5
Erklärung zur Stentposition:	
0 = Stent distal der nativen Klappe,	
1 = proximales Ende des Stents überdeckt native Klappe,	
2 = mittlerer Anteil des Stent überdeckt native Klappe,	
3 = distales Ende des Stents überdeckt native Klappe	

Eine Verbindung von Konduit und Stent zur nativen Wand durch einwachsendes Gewebe konnte bei allen Tieren beobachtet werden. Zwischen den einzelnen Follow-up-Gruppen konnten hierbei makroskopisch keine Unterschiede festgestellt werden. Wir beobachteten, dass ein Einwachsen des Stents im Bereich des zu Aorta hin gelegenen Segels am wenigsten stattgefunden hatte.

Die Klappen zeigten makroskopisch ein homogenes, weißlich glänzendes Gewebe. Bei einigen Klappen fielen kleine, flache, umschriebene, rötliche Verfärbungen sowohl der Wand, als auch der Segel auf. Größere thrombotische Auflagerungen an Segeln, Konduitwand oder Stent konnten bei keinem der Tiere gefunden werden. Es zeigten sich keine Hinweise auf eine Endokarditis.

Von oben betrachtet (aus Position der Pulmonalarterie) nahm die frei bewegliche Segelfläche zwischen den Tieren der einzelnen Follow-up-Gruppen mit zunehmender Follow-up-Dauer deutlich ab. Die in der 8 Wochen-Gruppe noch relativ nah aneinandergrenzenden Segel verkürzten sich mit längerem Verbleib der Klappen im Körper der Tiere immer weiter. Nach 16 Wochen zeigte sich eine so starke Retraktion der Segel, dass eine sternförmige Fläche in der Mitte der Klappe deutlich offenstand und ein suffizienter Schluss optisch nicht mehr möglich erschien. Bei den 24 Wochen-Tieren beobachteten wir eine breite Öffnung mit deutlich verkürzten Segeln (Abbildung 17).

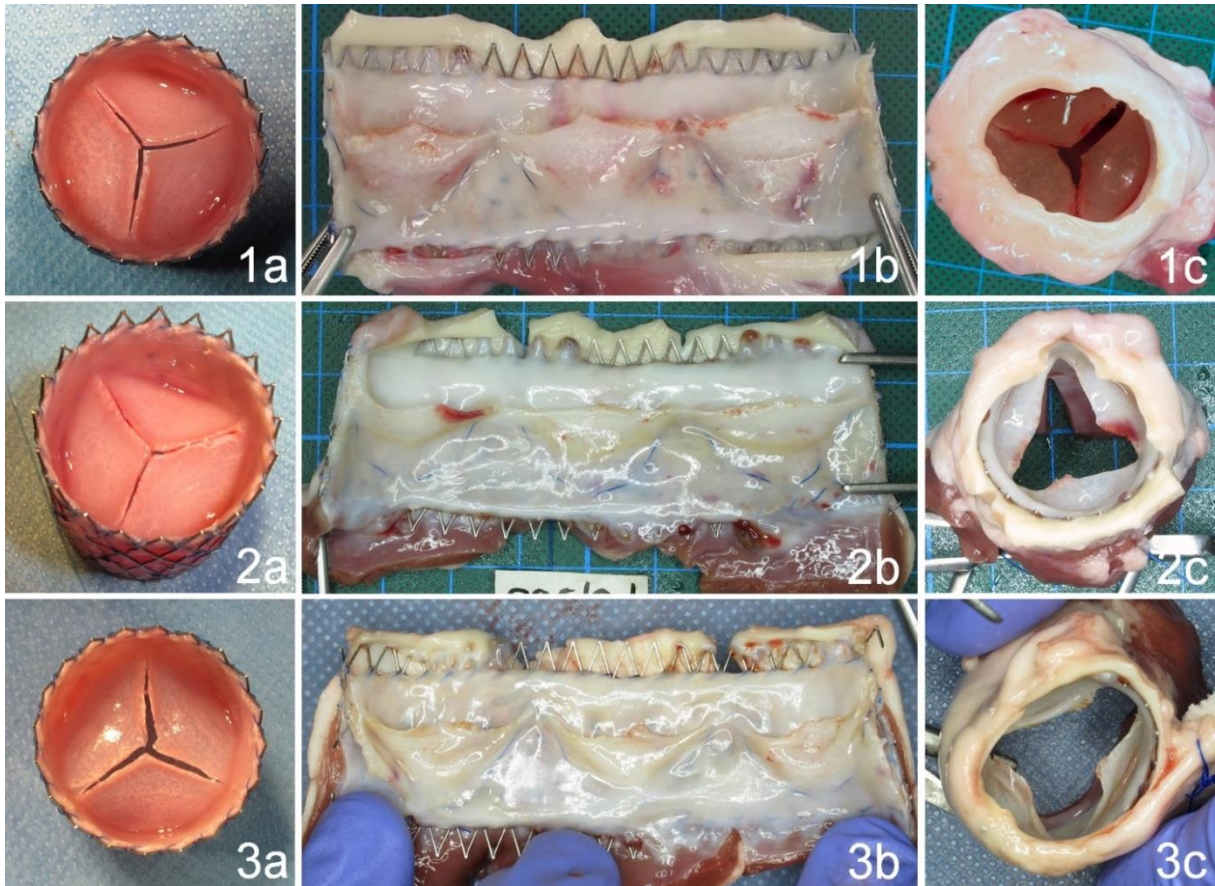


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Makroskopie von Klappen der Tiere der unterschiedlichen Follow-Up Gruppen (8 Wochen: 1 a-c, 16 Wochen: 2 a-c, 24 Wochen: 3 a-c). Bilder der Klappen vor Implantation mit aufgeschnittenen Segeln von oben (a), nach Explantation im aufgeklappten Stent (b) und nach Explantation in der Ansicht von oben (c). Die Klappen zeigten eine zunehmende Verkürzung der Segel. Diese wurde verstärkt durch ein Anwachsen der Segel an der Konduitwand.

Klappte man den Stent auf, so dass man in der Breite auf die Segel blicken konnte, zeigten sich starke Verwachsungen zwischen den Segeln und der Wand des tissue-engineerten Konduits. Das Ausmaß der Fusion konnte man anhand der Lage der unresorbierbaren Nähte abschätzen. Diese verliefen zu Beginn des Produktionsprozesses der Klappe noch direkt an der Unterkante des Sinus. Bei Explantation lagen die Nähte deutlich unterhalb des tiefsten erkennbaren Punkt des Sinus (Abbildung 18).

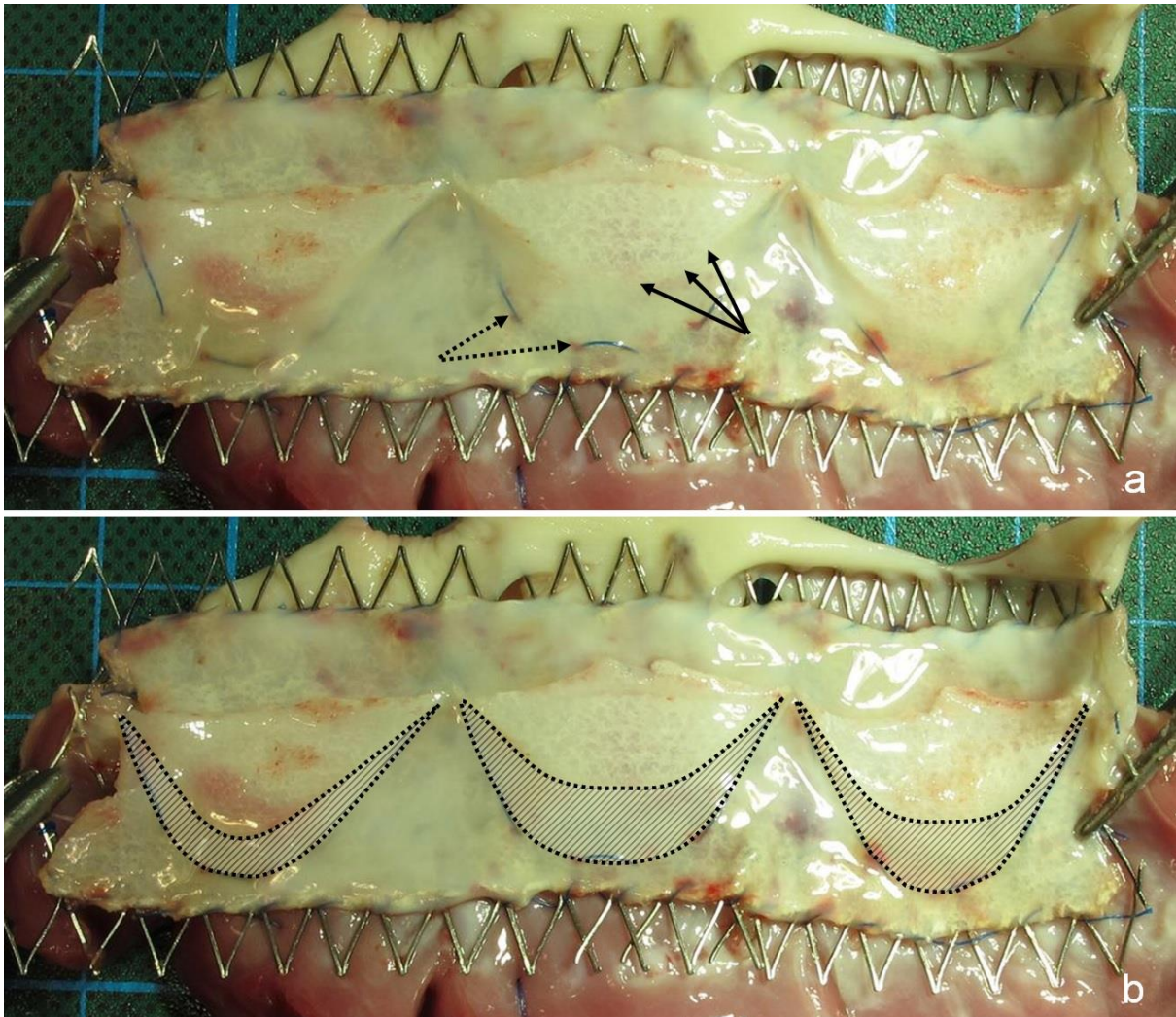


Abbildung 18: Darstellung der Verwachsung von Segel und Konduitwand. Die gestrichelten Pfeile im oberen Bild markieren die Naht, mit der das Konduit am Stent befestigt ist. Diese verlief vor der Kultivierung des Scaffolds im Bioreaktor noch direkt unterhalb des freien Sinus der Klappe. Die durchgezogenen Pfeile zeigen die Stelle bis zu der Segel und Wand verwachsen sind. In Bild (b) ist die Verwachsungszone zur Verdeutlichung markiert.

3.7. Histologie

3.7.1. Endothelialisierung

Mittels immunhistochemischer Färbungen mit Antikörpern gegen von Willebrand-Faktor konnte die Endothelialisierung der Klappensegel wie auch der tissue-engineerten Gefäßwand untersucht werden (Abbildung 19). Bereits nach 8 Wochen zeigte sich eine partielle Endothelialisierung. An der Sinusseite des Klappensegels war stets ein vollständig durchgehendes Endothel ausgebildet. Die ventrikulär gelegene Seite des Klappensegels und der distal gelegene Rand der Segelspitze waren zu diesem Zeitpunkt nur partiell endothelialisiert. Neun von 10 nach 16 und 24

Wochen explantierten Klappen zeigten unterdessen eine als vollständig zu betrachtende Endothelialisierung aller Abschnitte von Segel und Wand der dTE-Klappe. Minimale nicht bedeckte Anteile konnten aufgrund der erkennbaren Abrisskanten als präparations- und handhabungsbedingt identifiziert werden. Bei Tier 11B1 mit dem implantationsbedingt ausgerissenen Segel war auch nach 24 Wochen die Endothelialisierung nur partiell (Tier 11B1).

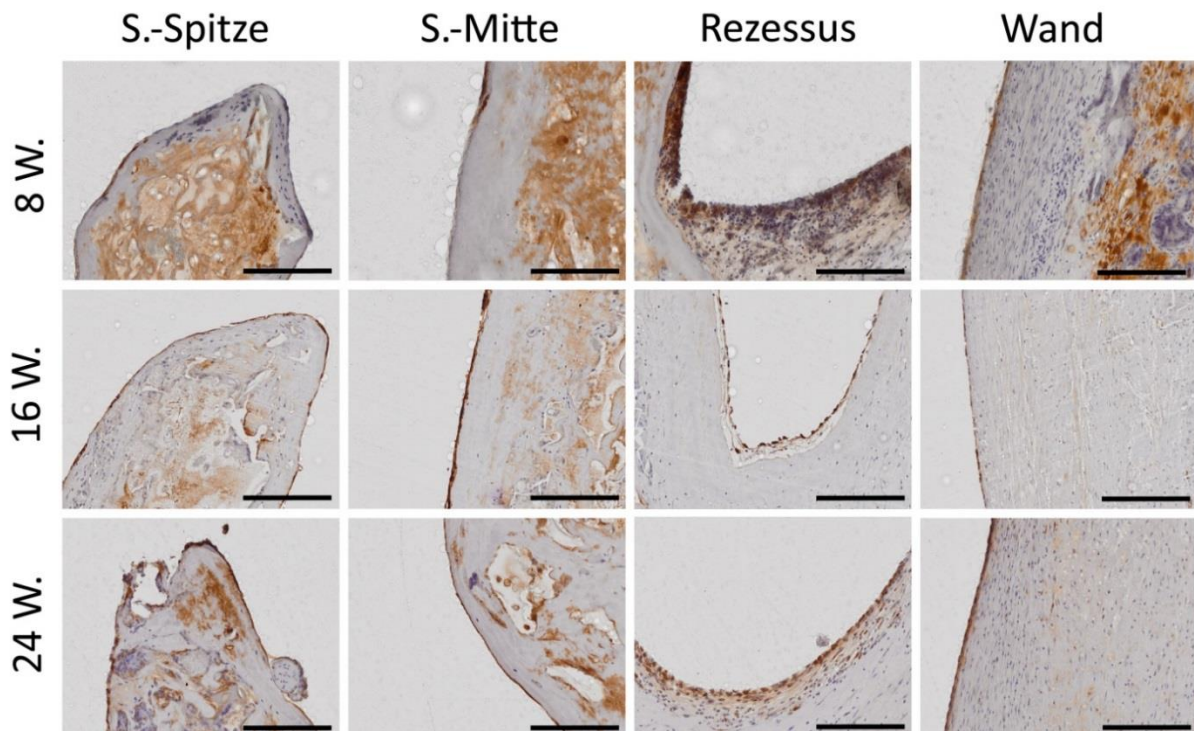


Abbildung 19: Endothelialisierung der Klappen. Färbung mit Antikörper gegen von Willebrand Faktor. Der Maßstab entspricht 200µm. Exemplarische Darstellung für die verschiedenen Follow-up Zeitpunkte. Die Zahlen links entsprechen den Follow-up Gruppen. Die Beschriftung oben kennzeichnet den abgebildeten Klappenabschnitt. S.-Spitze = Segelspitze, S.-Mitte = Segelmitte ventrikelseitig. Nach 16 Wochen zeigte sich eine vollständige Endothelialisierung von Klappe und Konduitwand.

3.7.2. Zellen im Gewebe

Histologisch konnte sowohl in den Segeln als auch in der tissue-engineerten Konduitwand ein gutes Einwanderungsverhalten neuer Zellen bestätigt werden (Abbildung 20). Bereits nach 8 Wochen ließ sich eine starke Besiedelung des tissue-engineerten Konduits mit Zellen feststellen, welche in der SMA-Färbung zu einem großen Teil als Myofibroblasten identifiziert wurden. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich auch erste Zellen locker verteilt im Segel der Klappe, welche vornehmlich eine fibroblastenartige Morphologie aufwiesen. Eine Einwanderung von Myofibroblasten in das Segel zeigte sich zum Zeitpunkt nach 8 Wochen noch nicht.

Nach 16 und 24 Wochen schien die Zellmenge im Konduit etwa konstant geblieben zu sein, wobei der Anteil an Myofibroblasten zu Gunsten von Fibroblasten optisch abzunehmen schien. Im gleichen Zeitraum nahm die Zellmenge im Segel deutlich zu. Nach 16 Wochen zeigten sich erstmals locker verteilte Myofibroblasten im Segel. Nach 24 Wochen schien der Anteil an Myofibroblasten im Segel noch einmal leicht zugenommen zu haben.

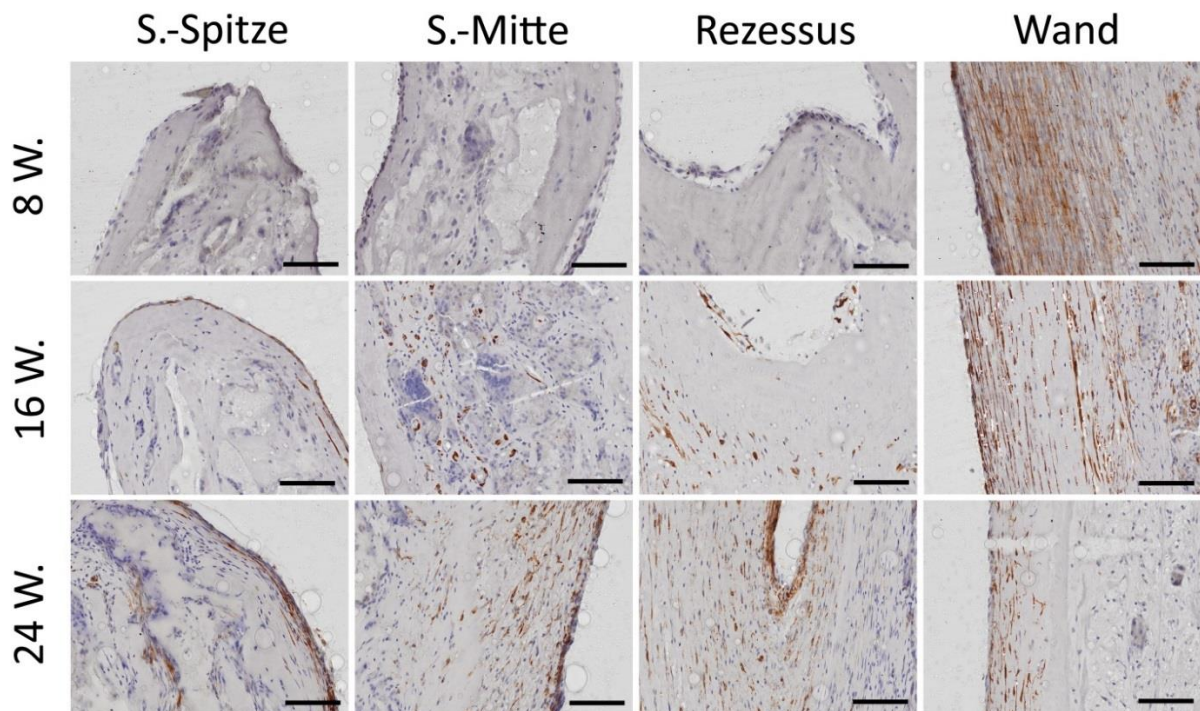


Abbildung 20: Re-Besiedelung der dTE-Klappe. α -SMA Färbung. Der Maßstab entspricht 50 μ m. Die Zahlen links entsprechen den Follow-up Gruppen. Die Beschriftung oben kennzeichnet den abgebildeten Klappenabschnitt. S.-Spitze = Segelspitze, S.-Mitte = Segelmitte. Die hier braun gefärbten Myofibroblasten finden sich nach 8 Wochen bereits in großem Ausmaß in der Konduitwand und nach 16 und 24 Wochen auch zunehmend im Klappensegel.

In allen Präparaten zeigten sich mäßige Infiltrationen von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen. Diese sammelten sich in räumlicher Nähe zu den verbliebenen Resten des Scaffolds und den Metallstreben des Stents. Die Anlagerung von Makrophagen um die Scaffoldreste war vor allem in der tissue-engineerten Wand des Konduits und in geringerem Maße um die Reste innerhalb des Klappensegels zu beobachten.

Akut entzündliche Prozesse mit Einwanderung von Granulozyten wie bei einer Endokarditis konnten in keinem der Präparate beobachtet werden. Ebenfalls blieb die Einwanderung von Lymphozyten auf ein physiologisches Maß beschränkt. Die Verteilung zwischen T- und B-Lymphozyten, nach Beurteilung durch die CD-3 und

CD-79a Färbung, lag bei etwa 50% / 50%. Nur bei einem der Tiere zeigte sich eine vermehrte lymphozytäre Infiltration im Bereich zwischen dem tissue-engineerten Konduit und der nativen Wand. In diesem Präparat überwogen die T-Lymphozyten gegenüber den B-Lymphozyten.

3.7.3. Matrixkonfiguration

3.7.3.1. Nicht implantierte Klappe

Zum Vergleich mit den Klappen der verschiedenen Follow-up-Gruppen wurde eine im Bioreaktor kultivierte und dann dezellularisierte, aber nicht implantierte dTE-Klappe herangezogen.

Die nicht implantierte Klappe zeigte in ihrem inneren Anteil in der Movat Pentachrom Färbung hellblau färbende, von amorpher Grundsubstanz umgebene, Scaffoldanteile. Um diese Schicht herum ließ sich eine durchgängige, in der Färbung gelb-grün imponierende, kollagene Bindegewebsschicht erkennen.

Das native Präparat zeigte, dass ein großer Teil der Verwachsungen zwischen Klappensegel und Konduitwand bereits im Bioreaktor entstanden war. Nahtmaterial, welches bei der Herstellung der Scaffoldmatrix zur Verknüpfung der Scaffoldanteile von Segel und Konduit genutzt worden war, konnte zum nachfolgenden Analysezeitpunkt als Anhaltspunkt dienen, wo sich ursprünglich (noch vor der Bioreaktorphase) der tiefste Punkt des Klappensinus befunden hatte. Oberhalb dieses Nahtmaterialknotens zeigte sich zum Analysezeitpunkt (nach der Bioreaktorphase) ein Keil aus kollagenem Bindegewebe, zwischen den hellblau färbenden Scaffoldanteilen von Segel und Konduit. Dieser Keil wies eine Länge von ca. 3 mm auf und stellte die Verwachsungszone dar (Abbildung 21).

3.7.3.2. Gewebeumbau in den implantierten Klappen

Nach 8 Wochen zeigte sich ein Umbau des Gewebes vor allem an der Konduitwand. Die hellblau imponierende amorphe Grundsubstanz und das Scaffold wurden hier weitgehend durch rot imponierendes muskuläres Material ersetzt. Im Vergleich zur Nativklappe trat die gelbliche Färbung des Kollagens in diesen Bereichen deutlicher hervor. Nach 16 und 24 Wochen waren analoge Veränderungen zunehmend auch im Bereich des Klappensegels sichtbar.

Die bei der nativen Klappe schon begonnene Verwachsung zwischen Segel und Konduitwand zeigte sich mit zunehmendem Follow-up noch weiter verstärkt.

Ein Anhalt für die Entwicklung von elastischen Fasern, konnte mittels der in dieser Arbeit verwendeten Plastic-Embedding-Histologie bei keiner der Klappen festgestellt werden (Abbildung 21).

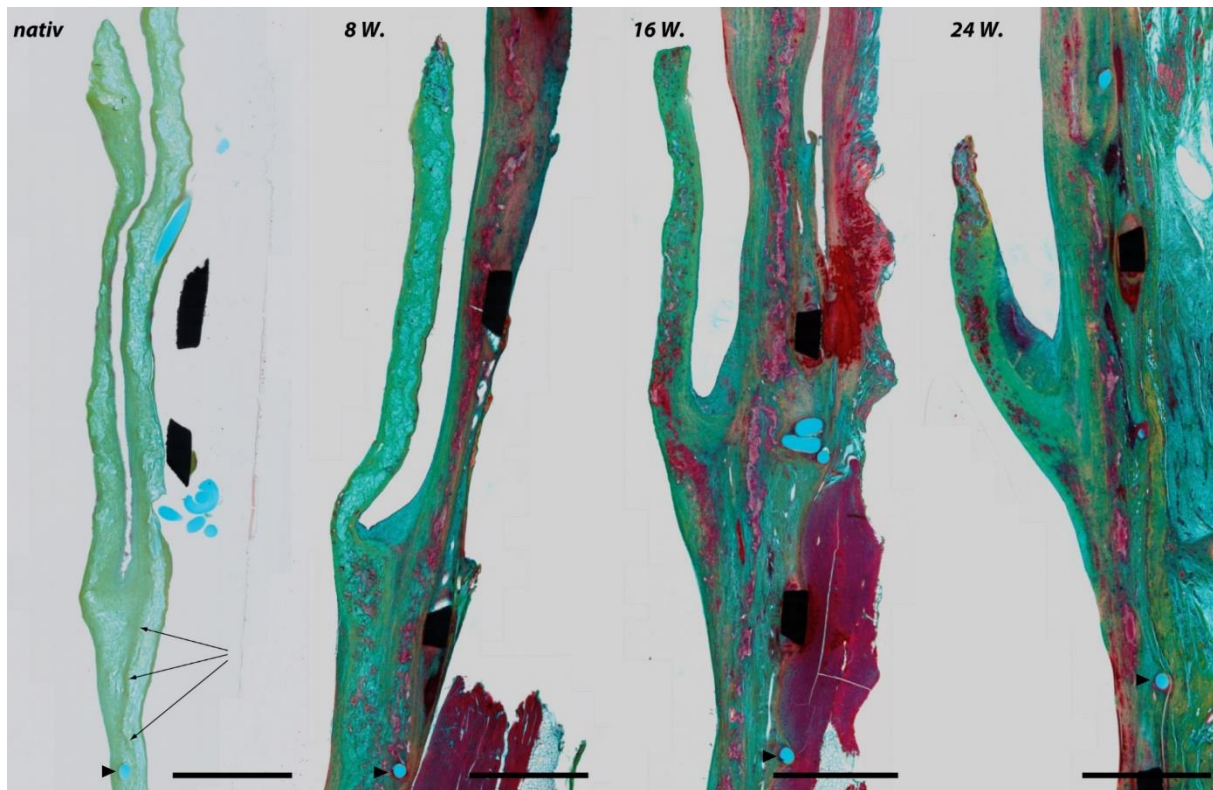


Abbildung 21: Entwicklung der extrazellulären Matrix. Movat-Pentachrom-Färbung. Der Maßstab entspricht 2 mm. Dargestellt sind eine native Klappe (im Bioreaktor kultiviert, aber nicht implantiert) sowie exemplarisch je eine Klappe eines 8, 16 und 24 Wochen Follow-up-Tieres. Das Segel ist jeweils links im Bild, die Konduitseite rechts. Die native Klappe zeigt einen bindegewebigen Keil von ca. 3 mm Länge (Pfeile) im Sinne einer Verwachsung zwischen Segel und Konduitwand die schon vor der Implantation entstanden war. Der vor der Bioreaktorphase ursprünglich tiefste Punkt des Sinus ließ sich anhand des verbliebenen Nahtmaterials (Pfeilspitzen) bestimmen. Die Verwachsung zeigte sich in der in-vivo Phase weiter progredient. Zum Zeitpunkt 8 Wochen ließ sich eine Durchsetzung der Grundsubstanz (hellblau) durch muskuläres Material (rot) und kollagenöse Fasern (gelb-grün) zunächst im Bereich des Konduits erkennen, die sich mit zunehmender Dauer auf das Segel ausbreitete.

3.7.4. Weitere Aspekte und besondere Auffälligkeiten

3.7.4.1. Einwachsen des Konduits und Stents

Sowohl das tissue-engineerte Konduit als auch der Stent zeigten eine Integration in die native pulmonalarterielle Wand durch neu gebildetes Gewebe. Die Kontaktfläche zwischen Konduit und nativer Wand war allerdings in den meisten Fällen nicht vollständig verwachsen sondern zeigte Lücken unterschiedlicher Größe (Abbildung 22, a). Die nicht verwachsene Fläche konnten nicht sinnvoll quantifiziert werden, da sie sich bereits innerhalb einer Schnittserie des gleichen Präparates deutlich

unterschied. In keinem Fall zeigte sich eine Thrombenbildung innerhalb dieser Lücken.

Die Stentstreben waren von einer Schicht aus vaskulärem Bindegewebe und SMA-positiven Myofibroblasten umgeben (Abbildung 22, b). In der näheren Umgebung zeigte sich zudem eine Ansammlung von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen (Abbildung 22, c).

3.7.4.2. Fibrinauflagerungen und Thrombusmaterial

Bei vier Tieren konnten Fibrinablagerungen an der ventrikulären Seite des Segels und am Klappenrand gefunden werden (Abbildung 22, e). Bei allen vier Tieren zeigte sich außerdem eine nur unvollständige Endothelialisierung.

Ebenfalls fanden sich in fünf Fällen Ablagerungen thrombotischen Materials im Klappenrezessus (Abbildung 22, f). An dieser Position war das thrombotische Material in keinem der Fälle freiliegend, sondern stets überdeckt von einer lockeren fibromuskulären Bindegewebsschicht. Vier der 5 Fälle waren Klappen mit unvollständiger Endothelialisierung von Tieren mit nur 8 Wochen Follow-up (Tabelle 10). Bei den Tieren, bei denen kein Thrombus im Bereich des Klappenrezessus gefunden wurde, zeigte sich ebenfalls fibromuskulär organisiertes Gewebe in dieser Region (Abbildung 22, g).

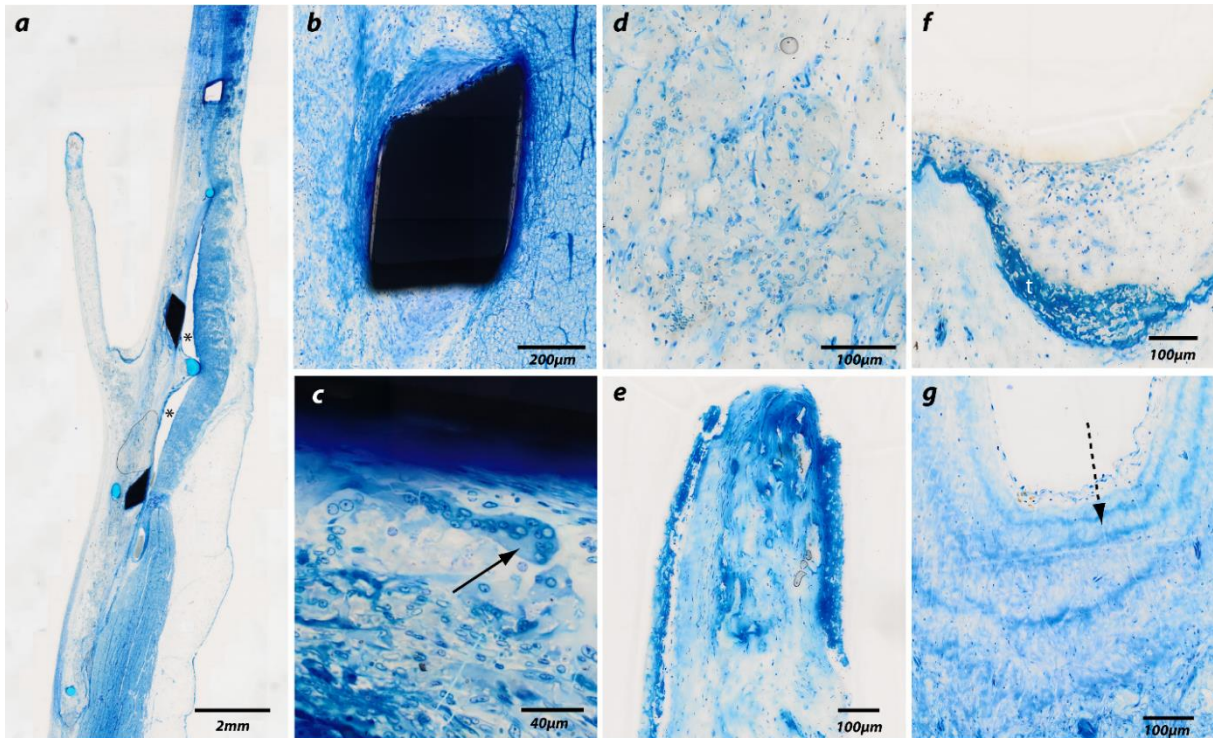


Abbildung 22: Besonderheiten und histologische Auffälligkeiten. Richardson-Blue Färbung. a = Klappenübersicht, b = Einwachsen des Stents, c = Fremdkörperriesenzellen in Umgebung des Stents, d= wolkig anmutendes Scaffoldmaterial, e = Fibrinauflagerungen an der Klappenspitze, f = Thrombus im Klappenrezessus, g = Kollagenfasern im Klappenrezessus am ehesten nach bindegewebigem Umbau eines Thrombus. Zeichenerklärung: * = Lücken in der Verwachsung zwischen Konduit und nativer Wand, durchgezogener Pfeil = Fremdkörperriesenzelle, t = Thrombus, gestrichelter Pfeil = Kollagenfasern

In den Übersichtsfärbungen der dTE-Klappen wurden weder in der Wand noch im Klappensegel Anzeichen für eine Kalzifizierung gefunden. In jeder Follow-up-Gruppe wurde probeweise bei je einem Tier eine von-Kossa-Färbung durchgeführt, in der sich ebenfalls keine Kalzifizierung demaskierte.

Unterschiede bezüglich der Polymerdegradation des Scaffolds zwischen den einzelnen Follow-up-Gruppen konnten mit unseren Methoden nicht festgestellt werden.

Tabelle 10: Endothelialisierung und thrombotische Eigenschaften der Klappe.

Tier	Follow up [Wochen]	Endothelialisierung	Fibrinauflagerung am Klappenrand	Thrombus im Rezessus
11B1	24	±	+	-
12B2	8	±	-	-
13B3	16	+	-	-
14B4	16	+	-	-
15B5	24	+	-	-
16C1	24	+	-	-
17C2	24	+	-	+
18C3	8	±	-	+
19C4	16	+	-	-
20C5	16	+	-	-
21D1	8	±	+	+
22D2	8	±	+	+
23D3	24	+	-	-
24D4	16	+	-	-
25D5	8	±	+	+

4. Diskussion

Etwa 1% aller Neugeborenen kommen mit einem angeborenen Herzfehler zur Welt [81]. Für einen Teil dieser Patienten stellt ein Ersatz der Herzklappe die einzige Möglichkeit dar, ein weitgehend „normales“ Leben führen zu können. Häufig ist von einem notwendigen Klappenersatz, nicht zuletzt auch sekundär wegen ihrer Verwendung in der Ross-Operation, die Pulmonalklappe betroffen [19].

Auch wenn es gelingt dem Kind mit einer neuen Herzklappe vorübergehend zu helfen, ist dieses in vielen Fällen nur von begrenzter Dauer. Bisher in der Klinik verwendete mechanische und biologische Klappenprothesen bringen zahlreiche Probleme mit sich. Für Kinder im Speziellen ist das fehlende Wachstumspotenzial der Ersatzklappen eines der gravierendsten. Ein wiederholter operativer Klappenersatz mit Anschluss an die sog. Herz-Lungen-Maschine ist häufig die Folge. In den letzten Jahren haben sich zunehmend minimalinvasive Methoden für den Klappenersatz in der Klinik etabliert. Bisherige Systeme funktionieren allerdings nur ausreichend suffizient, wenn sie sich auf einem bereits vorher chirurgisch eingesetzten und mit der Zeit verkalkten Klappenkonduit verankern können. Langzeitergebnisse bezüglich der Funktion minimalinvasiv eingebrachter Klappen liegen noch nicht ausreichend vor. Allerdings ist zu vermuten, dass diese Klappen analog zu den chirurgisch implantierten Klappen zur frühzeitigen Degeneration neigen [35,82].

Es erscheint demnach erstrebenswert, eine Herzklappe zu entwickeln, welche nicht auf Grund von Degeneration und fehlendem Wachstum wiederholt ersetzt werden muss. Das Konzept des Tissue-Engineerings bietet möglicherweise die Basis dafür. Dezellularisierte Klappen, gewonnen auf Basis einer zuvor mit Zellen besiedelten und kultivierten bioresorbierbaren Matrix, sind jüngst in die präklinische Untersuchung eingetreten [64,65,73]. Sie bieten die Möglichkeit, sich im Körper mit Zellen wiederzubesiedeln und könnten eventuell Wachstum und Anpassung an veränderte Bedingungen im Organismus gewährleisten. Weitere Vorteile zeigen sich in der unbegrenzten Verfügbarkeit und guten Lagerbarkeit dieser Konstrukte.

Diese Studie hatte das Ziel, die Vorteile von dezellularisierten tissue-engineerten Herzklappen und der minimalinvasiven transkutanen Implantation über einen peripheren Venenzugang zu verknüpfen. Die Funktionseigenschaften der Klappen im

Organismus sollten über ein Follow-up von bis zu einem halben Jahr untersucht werden.

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Wir konnten zeigen, dass die transvenöse Implantation tissue-engineerter dezellularisierter Herzklappen auf Basis biodegradierbarer Scaffolds aus PGA/P4HB und Myofibroblasten im Schafsmodell möglich ist.

Die Implantation war bei allen Tieren erfolgreich. Es ergaben sich jedoch Schwierigkeiten bei der Positionierung des Klappenstents im RVOT. Insgesamt konnten 87% der Stents wie geplant über der nativen Pulmonalklappe implantiert werden. Die verbleibenden 13% wurden zu weit distal in der Pulmonalarterie platziert. Beim Zurückziehen des Katheters ergaben sich wiederholt Probleme durch ein Verhaken der Katheterspitze in der abgelegten Klappe.

Direkt nach der Implantation waren 4 der 15 implantierten Klappen mit einem Regurgitationsgrad von „0“ optimal suffizient. Die Mehrzahl der Klappen wies allerdings eine milde oder moderate Insuffizienz auf. Im Laufe des Follow-ups entwickelte sich bei allen Klappen eine moderate oder schwere Insuffizienz. Als ursächlich für die schon zu Beginn prominente Insuffizienz stellte sich unter anderem eine relativ starke Ovalität der klappentragenden Stents heraus, welche sich auf Grund der umgebenden ovalen Struktur des RVOT ergab.

Eine Stenosierung der Klappe wurde nicht festgestellt. Bis zur Explantation verblieb der systolische Gradient über der Pulmonalklappe sowohl in der invasiven als auch der echokardiografischen Messung im physiologischen Bereich.

Nach der Explantation zeigte sich, dass der expandierte Stent in einigen Fällen stark in das Gewebe des Myokards und der Pulmonalarterie hineindrückte und dieses in 20% der Fälle sogar perforierte. Die Klappensegel zeigten sich, beginnend vom Sinusgrund, partiell mit der Konduitwand verwachsen, was eine starke Verkürzung zur Folge hatte und damit zur Insuffizienz beitrug. Zudem wirkten die Klappensegel in sich verkürzt.

Histologisch ließ sich eine gute Wiederbesiedlung der Klappen mit Endothelzellen und Myofibroblasten erkennen. Die Endothelialisierung der Klappen nahm mit Länge des Follow-ups zu und war bereits nach 16 Wochen bei allen Tieren durchgängig erfolgt. Die extrazelluläre Matrix wirkte gut ausgebildet und es konnten keine Anzeichen für eine auftretende Kalzifizierung gefunden werden. Es fanden sich

zahlreiche Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen, welche sich um die verbliebenen Scaffoldreste im Inneren der Klappe gruppierten.

4.2. Vergleich mit anderen Studien

4.2.1. Die minimalinvasive Implantation

Der minimalinvasive Pulmonalklappenersatz bietet zahlreiche Vorteile. Neben der Risikovermeidung einer OP am offenen Herzen, lassen sich durch den minimalinvasiven Eingriff die Krankenhausverweildauer, die postoperativen Schmerzen, die Narbenbildung und nicht zuletzt auch die Kosten deutlich reduzieren [83]. Gegenüber den bisher in der Klinik verwendeten Ballon-in-Ballon expandierbaren Stents könnte ein selbstexpandierbares Exemplar möglicherweise Vorteile in der Klappenhaltbarkeit bieten. Als Gründe hierfür kämen verbesserte Falteigenschaften während der Implantation und die Vermeidung des Ballon-Drucks auf die Klappe in Frage. Amahzoune et al. konnten in diesem Kontext zeigen, dass die von ihnen untersuchten Perikardklappen nach Crimping und in vitro simulierter Ablage histologisch weniger stark beschädigt wirkten, wenn die Einbringung in selbstexpandierbaren statt in ballonexpandierbaren Stents vorgenommen wurde [84]. Ein selbstexpandierbarer Stent könnte sich zudem durch seine Radialkraft auch im Verlauf noch an Veränderungen der anatomischen Gegebenheiten anpassen. Weiterhin würden hämodynamische Schwierigkeiten durch den Ballon-Verschluss des Gefäßes bei Implantation vermieden werden [85-87]. Allerdings bringt ein selbstexpandierbarer Stent auch Nachteile mit sich. Der Ausgleich einer vorbestehenden Ovalität des Ausflusstraktes etwa ist hiermit nicht möglich.

In den letzten Jahren hat es die ersten Ansätze gegeben, die möglichen Vorteile einer minimalinvasiven Implantation mit dem Einsatz vollständig tissue-engineerter Herzklappen zu kombinieren. Der verwendete Ansatz zur Implantation einer Pulmonalklappe bestand dabei häufig in der transapikalen Implantation, bei welcher der Katheter über eine Mini-Sternotomie und einen Einstich in rechten Ventrikel eingeführt und bis in Pulmonalklappenposition vorgeschoben wird [65,73,87,88]. Im Vergleich zu einer offen chirurgischen Implantation stellt dieser Ansatz zwar eine deutliche Reduktion der Invasivität dar, dennoch könnte durch ein transkutanes Einführen des Katheters über einen peripher gelegenen Venenzugang die Invasivität noch weiter reduziert werden.

Dieser Versuch beschreibt nach unserem Wissen erstmalig die perkutane, transvenöse Implantation einer vollständig tissue-engineerten Herzklappe auf Basis eines bioresorbierbaren Scaffolds in einem selbstexpandierbaren Stent. Aus diesem Grund sollten Machbarkeit und mögliche Ansätze für die Verbesserung des eigens entwickelten Ablagesystems evaluiert werden.

Die minimalinvasive Implantation konnte bei allen Tieren erfolgreich durchgeführt werden. Als Zugang für den Implantationskatheter wurde dabei die Vena jugularis verwendet. Der beim Menschen üblichere Implantationsweg über einen Zugang in der Leiste über die Vena femoralis war beim Schaf auf Grund schmaler Leistenvenenverhältnisse nicht möglich.

Unser Ablagesystem erforderte eine Mindestzuganggröße von 26 Fr, wenn die 8 mm Kapsel zur Ablage gewählt wurde, und eine Mindestgröße von 32 Fr, wenn die 10 mm Kapsel verwendet wurde (Verhältnis notwendige Dilatation zum Stent: 0,35)¹⁵. Die beiden Kathetersysteme für die momentan kommerziell erhältlichen Transkatheter-Pulmonalklappen erfordern eine etwas geringere Aufweitung der venösen Zugangsstelle. Jedoch ist der Durchmesser der bei diesen Systemen verwendeten Stents ebenfalls geringer, so dass das jeweilige Verhältnis ähnlich ist. Das Ensemble® Ablagesystem für die Melody® Transkatheter-Pulmonalklappe trägt an seiner Spitze eine Hülle mit 22 Fr Durchmesser und fasst Klappenstents bis zu einer Größe von 22 mm (Verhältnis notwendige Dilatation zum Stent: 0,33) [18,31]. Das Retroflex Delivery System der Edwards SAPIEN™ Klappe wird bei einem maximalen Stentdurchmesser von 26 mm über eine 22-24 Fr messende Schleuse eingeführt (Verhältnis notwendige Dilatation zum Stent: 0,31) [89]. Lutter et al. implantierten vergleichbar zu uns tissue-engineerte Klappen, allerdings auf Basis dezellularisierter porciner Pulmonalklappen, in selbstexpandierbaren Nitinolstents. Sie nutzen dazu einen Zugang über die Vena femoralis. Ihr Ablagesystem wurde über eine 22 Fr Schleuse eingeführt und hatte einen Durchmesser von 20 Fr. Die von ihnen verwendeten Nitinolstents waren jedoch mit einem Durchmesser von 22-24 mm auch deutlich kleiner als die Stents, welche in unserem Versuch verwendet wurden (Verhältnis notwendige Dilatation zum Stent: 0,30-0,33) [90]. Ein wichtiger Schritt zur weiteren Reduzierung der notwendigen Zuganggröße könnte in unseren

¹⁵ Quotient der maximal notwendigen im Versuch beschriebenen Dilatation der Zugangsstelle zum Außendurchmesser des Stents im vollexpandierten Zustand.

Versuchen durch eine weitere Ausdünnung des Klappenmaterials erzielt werden. So ließe sich auch ein Stent mit 30 mm Durchmesser noch weiter crimpen.

Die größten Schwierigkeiten und Probleme für den weiteren Verlauf ergaben sich während der Implantation bei der Positionierung des Klappenstents. Bei 2 der 15 Tiere erfolgte die Ablage der Klappe distal der nativen Pulmonalklappe, sodass diese nicht komplett vom Blutstrom ausgeschlossen wurde.

Mehrere Faktoren erschwerten die Ablage und können als ursächlich für die Fehlpositionierung angesehen werden:

Erstens verfügte unser Ablagesystem nicht über einen Rückhaltemechanismus für den Stent. Nachdem der Stent über einen gewissen Punkt aus dem Ablagesystem herausgeschoben worden war, ließ sich der Implantationsvorgang nicht mehr abbrechen und eine evtl. nicht optimale Position nicht mehr korrigieren. In dieser Hinsicht bietet beispielsweise das Valiant Captivia® Ablagesystem von Medtronic Ansätze für eine zukünftige Verbesserung. Hierbei handelt es sich um ein Ablagesystem für selbstexpandierbare Stents zur Therapie von Aortenaneurysmen. Es besitzt einen Rückhaltemechanismus, den sog. „tip capture“. Dieser greift am proximalen Ende des dazugehörigen Stentsystems in dafür vorgesehene Ösen und ermöglicht so eine kontrollierte Freisetzung [91]. Ein ähnliches System wird aktuell zur Implantation der CoreValve Evolute R™ Aortenklappe verwendet. Das hierfür verwendete EnVeo R Delivery System erlaubt einen Rückzug der Klappe in den Katheter sowie eine Repositionierung der Klappe bei bis zu 80% erfolgter Freisetzung [92,93].

Zweitens stellten die Knoten, mit denen die tissue-engineerte Klappe am Stent vernäht war, ein Problem bei der Klappenpositionierung dar. Befand sich eine große Anzahl dieser Knoten nach dem Crimping direkt auf einer Ebene, so bewirkte dies eine Umfangserhöhung des Stents. Die Knoten pressten sich in diesem Fall in das Material der Kapsel und es kam zu Verhakungen. Für das Ausschieben des Stents war in der Folge mehr Kraft erforderlich und die Freisetzung erfolgte spontaner und ruckartiger, was in einer ungenaueren Positionierung der Klappe resultierte. Eine Veränderung des Nahtmusters oder die Verwendung eines festeren Materials mit höherem Widerstand für die Kapsel könnten zu einer Verbesserung der Freisetzungseigenschaften und damit der Positionierung beitragen.

Drittens erschwerte bei der Implantation am schlagenden Herzen die systolisch / diastolische Verschiebung der Klappenebene eine optimale Positionierung. Über eine kurzzeitige Reduzierung der Herzbewegung ließen sich die Bedingungen der Positionierung ggf. verbessern. Hierfür kämen verschiedene Methoden in Betracht. Das sog. „rapid right ventricular pacing“ erhöht den Herzschlag kurzfristig auf eine Frequenz von etwa 240 Schläge/Minute und minimiert so den Blutauswurf und die Bewegung des Herzens. Auch über die Gabe von Adenosin, welches eine medikamentös induzierte Asystolie über einige Sekunden bewirken kann, könnten Verschiebungen der Klappenebene vermieden und somit die Positionierung erleichtert werden [94,95].

Allerdings bestehen derzeit noch keine Informationen über die Anwendbarkeit dieser Methoden im Schafsmodell.

4.2.2. Funktion der tissue-engineerten Klappe

Der Großteil der von uns verwendeten Klappen zeigte unmittelbar nach Implantation eine milde oder moderate Insuffizienz. Diese steigerte sich im Verlauf des Follow-ups bei allen Tieren bis zu einer moderaten oder schweren Regurgitation.

Ähnliche Probleme bezüglich der Insuffizienz der Klappen wurden schon von anderen Gruppen im Bereich des klassischen Tissue-Engineerings beschrieben. Gottlieb et al. beobachteten bereits nach 6 Wochen im Tierversuch eine milde bis moderate Insuffizienz ihrer auf Basis eines aus Polyglykolsäure und Poly-L-Milchsäure Scaffolds und mesenchymalen Stammzellen gezüchteten Klappe. Diese nahm bis zum geplanten Endpunkt der Studie nach 20 Wochen zu einer moderaten bis schweren Insuffizienz zu [56]. Ähnliches wurde von anderen Arbeitsgruppen sowohl nach chirurgischer [57,58,96] als auch nach transapikaler Implantation [65,73] beschrieben und hier mit einer Zunahme der Segelverkürzung im Follow-up begründet.

Wir fanden in unseren Untersuchungen unterschiedliche Faktoren, die als ursächlich für die Klappeninsuffizienz in Frage kamen und im Folgenden erläutert werden.

4.2.2.1 Verletzungen der Klappe bei Implantation

Bei Tier 11B1 wurde beim Rückzug des Katheters nach Implantation ein Klappensegel durch ein Verhaken des Katheters in der abgelegten Klappe ausgerissen. Dadurch ergab sich eine schwere Insuffizienz. Als Konsequenz wurde

noch innerhalb der Versuchsreihe die Spitze des Ablagesystems rückseitig angeschrägt. In der Folge trat ein Verhaken nur noch ein weiteres Mal auf und konnte in diesem Fall durch vorsichtiges Vor- und Zurückschieben des Katheters behoben werden. Die Gefahr der Verletzung der Klappe wurde dadurch minimiert. Weiterhin löste sich bei Tier 24 während der Implantation die Kapsel vom Ablagesystem, was eine Bergung und ein erneutes Crimping der Klappe nötig machte. Hierdurch wurde die Klappe verletzt. Sie zeigte nach der Implantation eine moderate Insuffizienz. In unserem Versuch stand keine Ersatzklappe für diesen Fall zur Verfügung und es musste folglich auf das schon belastete Exemplar zurückgegriffen werden. Durch die Verfügbarkeit von Ersatzklappen könnte dieses Problem behoben werden.

4.2.2.2 Ovalität der Stents

Ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Ovalität des Stents und der Insuffizienz der Klappe konnte in der Korrelationsanalyse nachgewiesen werden. Keutting et al. beschrieben jüngst erstmals eine in vitro Untersuchung von Auswirkungen der Ovalität der Aortenklappe auf die Funktionalität von in selbstexpandierbaren Stents eingebrachten Klappenprothesen. Sie nutzten hierfür die kommerziell verfügbare Core Valve®. Ihre Ergebnisse zeigten eine geringe Abnahme der Regurgitation im Falle einer leichten Stentovalität und eine deutliche Zunahme bei starker Ovalität [97].

In unseren Versuchen war ein gleichmäßiger Schluss der Klappe schon bei weniger stark ausgeprägter Ovalität des Stents bei einigen Tieren nicht mehr möglich, da die Segel auf eine unterschiedliche Ebene zurückschlügen und nicht mehr miteinander koaptieren konnten. Ein Grund für die bei uns schon bei leichter Stentovalität beobachteten Auswirkungen auf den Insuffizienzgrad der Klappen dürfte das Klappendesign ohne Koaptationszone sein. Die Nutzung von Klappen mit verlängerter Koaptationszone könnte evtl. Abhilfe bringen. Eine verlängerte Koaptationszone könnte auch bei Zurückschlagen der Segel auf leicht abweichende Ebenen noch einen suffizienten Schluss der Klappe ermöglichen.

4.2.2.3 Verkürzung der Segel

Direkt nach dem manuellen Auftrennen der Klappensegel mittels Skalpell ergab sich eine leichte Spaltbildung zwischen den Segeln und im zentralen Bereich der Klappe. Dasselbe Problem wurde bereits durch Weber et al. beschrieben [65].

Van Vlimmeren et al. berichteten in ihren Versuchen von dem Retraktionsverhalten der Klappensegel und konnten nachweisen, dass dieses zu einem großen Teil auf die zelluläre Komponente in der Klappe zurückzuführen war und durch Dezellularisierung deutlich reduziert, aber nicht vollständig aufgehoben werden konnte [98]. Es verbleibt ein Rest sog. passive Retraktion durch die extrazelluläre Matrix. Diese trat in unserem Versuch bei Auftrennung der im Bioreaktor zusammengewachsenen Segel und somit Aufhebung der Zugbeanspruchung zu Tage. Auf Grund der in vitro erzeugten Formgebung der in unseren Versuchen benutzten Klappen war die zu Beginn ausgebildete Koaptationszone bereits nur minimal. Daher gab es nicht ausreichend Spielraum, um diese Retraktion durch eine größere Fläche aneinander liegenden Gewebes zu kompensieren und weiterhin einen suffizienten Schluss zu ermöglichen.

Ebenfalls konnten Van Vlimmeren et al. nachweisen, dass in den ersten zwei Wochen nach Besäen eines biodegradierbaren Scaffolds aus PGA/P4HB dieser noch ausreichend Gegenkraft bot, um eine Retraktion der Segel zu verhindern. Anschließend nahm der Gehalt des Scaffolds durch seinen biologischen Abbau ab und es folgte die Verkürzung der Segelfläche. Hierdurch kam es zu einer Insuffizienz [99]. Sie sahen Möglichkeiten zur Überwindung dieses Problems zum Beispiel in einem langsamer degradierenden Scaffold. Bis zum beginnenden Kraftverlust des Scaffolds durch Degradation würde dann bereits ein festeres Eigengewebe der Klappe entstanden sein.

Diese Beobachtungen könnten auch eine Erklärung dafür bieten, dass vergleichbare Insuffizienzen in der Vergangenheit nicht bei der Verwendung von dezellularisierten biologischen Klappen beschrieben wurden. Metzger et al. führten die Implantation von dezellularisierten und nachfolgend mit Fibroblasten und Endothelzellen kultivierten porcinen Pulmonalklappen in Verbindung mit einem mit Dünndarmsubmukosa ausgekleideten Nitinolstent durch. Sie berichteten nach einem Follow-up von vier Wochen von einer nicht vorhandenen bis trivialen Insuffizienz der Klappen [67].

In Versuchen von Quinn et al. wurden dezellularisierte Pulmonalklappen mit kryokonservierten Pulmonalklappen und porcinen Aortenklappenbioprothesen

verglichen [100]. Nach einem Follow-up von 20 Wochen zeigte keine der Klappen ein schlechteres Ergebnis als eine milde Insuffizienz.

Cebotari et al. konnten mit dezellularisierten Homografts sogar eine Abnahme des Insuffizienzgrades im Follow-up gegenüber dem Wert nach Implantation feststellen. Sie implantierten dezellularisierte menschliche Pulmonalklappen, welche mit mononukleären Zellen wiederbesiedelt und im Bioreaktor kultiviert worden waren, in zwei pädiatrische Patienten. Nach 3,5 Jahren war bei einer Zunahme des Pulmonalklappendurchmessers eine Abnahme der milden Insuffizienz hin zu einer trivialen feststellbar [52].

Diese Ergebnisse geben Anhalt dafür, dass eine Verkürzung der Segel bei Verwendung eines biologischen Scaffolds nicht im gleichen Ausmaß wie bei der Verwendung bioresorbierbarer Scaffolds zu Tage tritt, höchstwahrscheinlich, weil dieser auch über längere Zeit durch seine extrazelluläre Matrix eine Gegenkraft zur Retraktionstendenz aufrechterhält.

Ein anderer Grund für die aktuell funktionelle Überlegenheit dezellularisierter biologischer Klappen bezüglich der Insuffizienz wäre die an die natürlichen Bedingungen angepasste Form. Diese scheint bei den bioresorbierbaren Scaffolds und den aus ihnen gezüchteten Klappen noch nicht optimal nachgebildet zu sein. Van Loosdregt et al. berichteten, dass sich durch Optimierung der Form der tissue-engineerten Klappen evtl. der diastolische Druck auf die Klappe erhöhen ließe, was eine verstärkte Gegenkraft zu Retraktionstendenz der Klappensegel liefern würde [101].

4.2.2.4 Verwachsungen von Klappensegeln mit der Konduitwand

Durch Geometrieänderungen ließe sich möglicherweise auch ein weiteres von uns beobachtetes und mit der zunehmenden Insuffizienz der Klappen assoziiertes Problem beheben. Bei Explantation entdeckten wir Verwachsungen der Klappensegel mit der tissue-engineerten Konduitwand im Bereich des tiefsten Punkt des Sinus. Die Verwachsungen konnten histologisch als ein Keil aus kollagenem Bindegewebe sowie einer oberhalb davon liegenden fibromuskulär organisierten Zellschicht identifiziert werden. In der Folge führten die Verwachsungen zu einer Verringerung der frei beweglichen Segelfläche.

Wir untersuchten histologisch auch eine native Klappe, die zwar im Bioreaktor kultiviert, aber nie implantiert worden war. Es zeigte sich auch hier ein kollagener Keil

zwischen Klappe und Konduitwand im Sinne einer Verwachsung. Es ist somit anzunehmen, dass auch große Teile der Verwachsungen der implantierten Klappen bereits im Bioreaktor entstanden waren. Dieser Umstand könnte die von Beginn an ungünstige Klappenform mit ihrer kaum ausgebildeten Koaptationszone trotz eines initial adäquat geformten Scaffolds erklären. In Zukunft wird es daher essentiell sein, das Auftreten von Verwachsungen schon innerhalb des Bioreaktors zu verhindern, um eine funktionell geeignete Klappenform zu erhalten. Versuche zur Verwendung sog. „Inserts“, formgebender Einschübe, welche während der Kultivierungsphase im Bioreaktor die Klappensegel bis an den Sinusgrund offen halten und ihm eine bauchige Form verleihen, befinden sich derweil in der Erprobung [102].

Im Gegensatz zum kollagenen Bindegewebe zeigte die Nativklappe keine fibromuskulären Ablagerungen analog zu den Klappen nach Explantation. Demnach ist davon auszugehen, dass die fibromuskulären Ablagerungen erst in vivo entstanden sind. Wir vermuten, dass abgelagertes thrombotisches Material hierfür die Ursache war. Bei einigen der Tiere aus der 8 Wochen Follow-up Gruppe fanden sich Reste eines Thrombus überdeckt von einer Schicht fibromuskulären Gewebes. Dies bringt uns zu der Ansicht, dass das neue Gewebe erst durch Umbau eines Thrombus entstanden sein könnte.

Die Verwachsungszone zwischen Segel und Wand stellte den tiefsten Punkt des Segels dar. Möglicherweise wurde dieser Punkt nicht ausreichend durch den Blutstrom ausgewaschen, so dass thrombotisches Material an dieser Stelle verblieb, auf dessen Basis sich das thrombofibrotische Verwachsungsgewebe bilden konnte. Das gleiche Problem wurde jüngst von Driessen-Mol et al. beschrieben. Sie implantierten dezellularisierte Klappen auf Basis eines biodegradierbaren Scaffolds transapikal in Pulmonalklappenposition. Nachdem die Klappen bis zu einem Zeitpunkt von 4 Wochen noch voll suffizient gewesen waren, nahm die Regurgitation in einem Follow-up von 24 Wochen bis zu einer moderaten oder schweren Insuffizienz zu. Als Grund nannten auch sie die kontinuierlich zunehmende Verwachsung von Segel und Wand [73].

Strömungsuntersuchungen in vivo mittels 4D-Fluss in der Magnet-Resonanz-Tomographie könnten weitergehende Aufschlüsse bezüglich des Blutflusses in der Hinge Region liefern.

Eine Verbesserung des Klappendesigns könnte durch eine „bauchigere“ Form des Sinusgrundes erreicht werden. Der tiefste Punkt des Sinus läge dann im Optimum

nicht mehr direkt in der Hinge Region, so dass die Auswaschung der Hinge Region verbessert werden könnte.

Eine andere Möglichkeit bestünde in der Entfernung der hinter dem Segel gelegenen Konduitwand, so dass eine Verwachsung zwischen beiden Strukturen nicht mehr möglich wäre. Diese Methode hätte allerdings evtl. negative Effekte bezüglich der Entwicklung paravalvulärer Lecks zur Folge.

Welcher Anteil der Insuffizienz den unterschiedlichen Beobachtungen zugerechnet werden kann, war auf Grund ihres kombinierten Vorliegens schwer zu evaluieren. Ausschlaggebend für die Überwindung aller hier diskutierten Probleme dürfte allerdings eine Überarbeitung des Designs der Klappenmorphologie sein.

4.2.3. Stenosierung

Entgegen der noch nicht zufriedenstellenden Ergebnisse bezüglich der Insuffizienz konnten die in diesem Versuch verwendeten Klappen bezüglich anderer Funktions- und Erscheinungsparameter sehr vielversprechende Ergebnisse liefern.

Ein gravierendes Problem momentan in der Klinik verwendeter Klappenprothesen ist die Stenosierung. Bedingt durch fehlendes Wachstum, Proliferation der Neointima und Kalzifizierung neigen die Klappen dazu den Ausfluss des Blutes aus dem rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie zu behindern [103,104].

Die Ballondilatation von stenosierten Klappen und Konduits kann eine vorübergehende Verbesserung der Flussbehinderung bewirken und damit den notwendigen Ersatz der Klappe hinauszögern. Dies ist gerade bei Kindern von großer Bedeutung, da hierdurch die Häufigkeit des Klappenersatzes während des Wachstums reduziert werden kann [105]. Die Insuffizienz der Klappen kann nach der Ballondilatation allerdings durch die Aufweitung und den Druck des Ballons auf die Klappe verstärkt sein [106]. Es wäre daher vorteilhaft, das Entstehen einer solchen Stenosierung von Beginn an verhindern zu können.

In unserem Versuch zeigte sich im Verlaufe des Follow-ups sowohl in der invasiven Blutdruckmessung (nach Implantation und vor Explantation) als auch in der echokardiographischen Messung (alle vier Wochen) nur eine minimale Zunahme des systolischen Gradienten über der Pulmonalklappe. Diese erreichte statistisch keine Signifikanz und war stets im physiologischen Bereich. In keiner der Klappen zeigte sich demnach eine Stenosierung.

Ähnlich vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Stenosierung konnte die Züricher Gruppe um Simon Hoerstrup sowohl mit klassisch tissue-engineerten Klappen als auch mit klassisch tissue-engineerten und nachfolgend dezellularisierten Klappen erzielen [57,73].

Dies lässt vermuten, dass obwohl ein Gewebe-Remodelling bei den tissue-engineerten Klappen auftritt, sich keine stenosierende Neointima formiert.

4.2.4. Makroskopische Analyse

In Versuchen mit klassisch tissue-engineerten Klappen, welche nicht dezellularisiert waren, wurde über eine Verdickung der Klappen berichtet [87]. Diese Verdickung trat mit einem Höhepunkt um Woche 8 des Follow-ups auf und nahm anschließend wieder ab. Diese Beobachtung ließ die Autoren die Verdickung als einen natürlichen Prozess deuten, der durch das Remodelling des Gewebes verursacht wird [57].

Eine Verdickung der Klappen in ähnlichem Ausmaß konnte in unseren Versuchen mit dezellularisierten Klappen trotz der guten Wiederbesiedelung zu keinem Follow-up-Zeitpunkt in der makroskopischen Analyse nach Explantation festgestellt werden.

Nach der Explantation fanden sich wie beschrieben deutlich verkürzte und verwachsene Segel. Dennoch befand sich der verbliebene Rest der Segel zu jedem Follow-up-Zeitpunkt in einem guten Zustand. Die Klappen wirkten glatt und Hinweise auf eine Endokarditis konnten bei keiner der Klappen gefunden werden.

Auffällig war das starke Einpressen des Stents in das pulmonalarterielle Gewebe. Teilweise konnte sogar eine Perforation des Gewebes durch Stent-Streben beobachtet werden. Das Ausmaß dieser Beobachtung ist sicherlich zu einem Teil durch die post-mortem Analyse begründet. In Folge der fehlenden Blutfüllung der Pulmonalarterie nach Explantation kam es zu einem Kollaps des pulmonalarteriellen Lumens, wodurch die partielle Aufspreizung durch den Stent deutlicher hervorgetreten sein dürfte, als es in vivo der Fall gewesen wäre. Es bleibt aber zu kritisieren, dass in dieser Studie aus logistischen Gründen keine größenangepassten Stents verwendet wurden. Optimal wäre es, den Tieren nach einem initialen CT einen ihren nativen Strukturen im Durchmesser angepassten Stent zu implantieren.

Ein weiteres Ergebnis der makroskopischen Analyse war das gute Anwachsen des tissue-engineerten Klappenkonduits am nativen Gewebe der Pulmonalarterie. Bereits nach 8 Wochen konnte eine Verbindung beobachtet werden. Dieser Faktor ist besonders entscheidend mit Blick auf die Weiterführung des Tissue-Engineering-

Konzeptes: Ein potenzielles Wachstum der Klappe wurde in unserem Versuch noch durch den metallischen Stent begrenzt. Ein ähnlich dem Scaffold degradierender Stent könnte mehr Raum für Wachstum ermöglichen. Hierbei müsste jedoch sichergestellt sein, dass zum Zeitpunkt der Stentdegeneration eine ausreichende Verwachsung des Konduits mit der nativen Pulmonalklappe stattgefunden hat. In unserem Versuch konnte beobachtet werden, dass das Anwachsen des Konduits von der korrekten Positionierung des Stents abhängig war. Bei zu weit proximaler Implantation ragte das Konduit partiell in den Ventrikel und ein komplettes Anwachsen war nicht möglich. Im Falle einer Degradation des Stents könnte dies hämodynamische Folgen haben. Die korrekte Positionierung des Stents würde bei der Nutzung degenerierbarer Stents somit noch weiter an Bedeutung zunehmen.

4.2.5. Histologie

Damit eine dezellularisierte Herzklappe das Potential für Anpassung an sich verändernde Umweltaforderungen oder sogar Wachstum zeigt, ist eine Wiederbesiedelung in vivo Grundvoraussetzung. Eine solche konnte in unseren Klappen beobachtet werden.

4.2.5.1. Endothelialisierung

Viele vorhergehende Studien konnten nur eine partielle Endothelialisierung der von ihnen verwendeten vollständig tissue-engineerten Klappen bis zum Ende des Follow-ups nachweisen [50,57,61,73,88,96]. Die in diesem Versuch untersuchten Klappen zeigten hingegen eine vollständig durchgehende Endothelialisierung. Bereits nach 8 Wochen war eine Auskleidung mit Endothel partiell vorhanden, wobei ventrikulär gelegene Segelbereiche nur lückenhaft bedeckt waren. Bei allen Tieren¹⁶ mit einer Nachbeobachtungszeit größer oder gleich 16 Wochen konnte unterdessen eine durchgehende Endothelzellschicht beobachtet werden.

4.2.5.2. Wiederbesiedelung

Neben der Endothelbesiedelung konnte auch in den inneren Bereichen von sowohl Segel als auch tissue-engineerter Wand ein gutes Zelleinwanderungsverhalten festgestellt werden. Fibroblasten besiedelten schon nach 8 Wochen das Segel.

¹⁶ Mit Ausnahme von Tier 11, bei welchem ein Segeleinriss als Grund für das Nicht-Vorhandensein vermutet wird.

Myofibroblasten fanden sich zu diesem Zeitpunkt in reichlichem Ausmaß nur in der Wand des Konduits. Im weiteren Verlauf des Follow-ups waren sie auch in den Klappensegeln nachweisbar.

Neben diesen Zellen zeigte sich außerdem eine moderate Infiltration des Klappenkonduits mit Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen. Diese formierten sich vornehmlich um die verbliebenen Reste des Scaffolds in der Konduitwand und um die metallischen Streben des Stents. Das Auftreten dieser Zellklasse im Segel war deutlich geringer, was durch das Fehlen von Blutgefäßen als Eintrittspforte für Makrophagen in diesem Bereich zu erklären sein dürfte. Das moderate Maß der entzündlichen Reaktion stellt sich für uns als ein natürlicher Prozess zum Abbau von Fremdmaterial dar. Wir gehen davon aus, dass dieser Prozess für die Funktion der Klappe weniger nachteilig als sogar nützlich ist, im Sinne einer Anpassung der extrazellulären Matrix an die unter der Blutströmung wirkenden Zug- und Druckkräfte. Es ergab sich kein Anhalt für einen akut entzündlichen Prozess gegen das tissue-engineerte Material. Granulozyten wurden in keinem der Präparate beobachtet und die lymphozytäre Infiltration mit einem ausgeglichenen Verhältnis zwischen B- und T-Lymphozyten erschien als physiologischer Prozess im Rahmen des Gewebeumbaus. Lediglich bei einem Präparat zeigte sich eine stärkere lymphozytäre Infiltration an der Grenzfläche zwischen nativer Wand und Konduit. Die T-Lymphozyten überwogen hier deutlich. Gründe für diese Auffälligkeit konnten nicht sicher verifiziert werden. Eine virale Infektion könnte ebenso Ursache sein, wie eine Immunreaktion auf ein Antigen der Klappenmatrix.

4.2.5.3. Extrazelluläre Matrix

Einhergehend mit der Zellinfiltration stellte sich der Matrixumbau des Gewebes dar. Eine optisch qualitativ bestimmte Zunahme des Kollagengehaltes mit der Zeit verdeutlichte wichtige Umbauvorgänge im Implantat.

Mittels der in dieser Arbeit verwendeten Plastic-Embedding-Histologie und den von uns verwendeten Färbungen konnten in keiner der Klappen klare Anzeichen für eine Bildung elastischer Fasern gefunden werden. Unsere Projektpartner in Zürich führten an einem anderen von uns übersandten Segel der Klappe allerdings weitere histologische Untersuchungen mittels Paraffineinbettung und Elastica van Gieson Färbung durch. Diese konnte in allen Präparaten das Vorhandensein von Elastin

nachweisen. Somit ist hier von einem methodischen Fehler im Rahmen der von uns verwandten Färbung auszugehen.

Die Ergebnisse des Züricher Projektpartners bezüglich des Vorhandenseins von Elastin sind kongruent zu denen anderer Tissue-Engineering Gruppen. Diese berichteten ebenfalls von einem Fehlen elastischer Fasern nach der in vitro Produktion, welche sich dann aber in vivo entwickelten [57-59,73]. Die von uns implantierten Klappen zeigten damit eine der physiologischen Klappenkonfiguration ähnelnde Zusammensetzung.

4.2.5.4. Kalzifizierung

Ein häufig beschriebenes Problem bisher verwendeter biologischer Klappenprothesen stellt die Kalzifizierung dar [27]. Auch bei Verfahren des Tissue-Engineerings, welche mit der Dezellularisierung biologischer Klappen arbeiten, wurde wiederholt eine beginnende Klappenkalzifizierung beobachtet. Metzger et al. berichteten bereits nach vier Wochen Follow-up von milden Kalzifizierungsprozessen der von ihnen verwendeten dezellulierten und mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten porcinen Pulmonalklappen [67]. Leyh et al. konnten 2003 feststellen, dass dezellulierte porcine Klappen bezüglich der Kalzifizierung deutliche Vorteile gegenüber ovinen¹⁷ Allografts brachten. Dennoch stellten auch sie bei den dezellulierten porcinen Klappen nach 24 Wochen eine Kalzifizierung fest [107].

In unseren Versuchen konnte auch nach 24 Wochen Follow-up weder in den Segeln noch in der Wand ein Anzeichen für eine Kalzifizierung gefunden werden. Diese Beobachtung ist besonders in Anbetracht dessen von Bedeutung, dass Lichtenberg et al. die Wichtigkeit einer Endothelialisierung der Klappen vor der Implantation bezüglich der Vermeidung von Kalzifizierungen betonen [50]. Eine solche der Implantation vorausgehende Besiedelung der Klappe mit Endothel wurde bei uns nicht durchgeführt. Trotzdem zeigten sich keine Anzeichen für eine Kalzifizierung.

¹⁷ Vom Schaf stammend

4.3. Limitationen dieser Studie

Die Ergebnisse dieser Studie sind nur eingeschränkt auf einen Einsatz im Menschen übertragbar. In Hinsicht auf das Fernziel eine Klappe für pädiatrische Patienten mit kongenitaler Herzerkrankung zu entwickeln, müssen verschiedene Einschränkungen unserer Studie diskutiert werden. Für diese Versuche wurden Schafe verwendet, welche vor der Klappenimplantation über ein intaktes Herz-Kreislauf-System verfügten. Bei den meisten erkrankten Kindern würden sich allerdings zum Zeitpunkt des Klappenersatzes neben der Klappendysfunktion schon Vorschädigungen, wie etwa eine Dilatation des rechten Ventrikels, finden. Diese Vorschädigungen könnten unvermutete Einflüsse auf die Funktion der neu implantierten Klappe haben. Ebenfalls könnte die Katheterablage der Klappe in einem anatomisch deformierten RVOT erschwert sein.

Eine weitere Einschränkung dieser Studie war, dass keine größenangepassten Klappen verwendet wurden. Der native Pulmonalklappendurchmesser unserer Tiere zeigte eine starke Heterogenität (17 – 30 mm). Die Implantation einer Klappe mit standardisierter Größe in allen Tieren unabhängig vom nativen Pulmonalklappendurchmesser könnte negative Effekte auf die nachfolgende Funktion der implantierten Klappe gehabt haben. Eine vorhergehende Bestimmung der Größe der nativen Pulmonalklappe könnte in weiteren Studien die Verwendung größenangepasster Klappen ermöglichen und möglicherweise einen Vorteil für die zukünftige Anwendung im Menschen bieten.

Für eine exakte Beurteilung der Ergebnisse zur Klappenfunktion nach Implantation aus CT und ICE stellte der Abstand der beiden Untersuchungen von jeweils mindestens einer Woche eine Limitation dar. Ein CT Termin direkt nach der Implantation war auf Grund der schwer abschätzbaren Dauer des Eingriffes schlecht zu organisieren. Ein früherer CT Termin in der Woche nach Implantation war auf Grund von Auflagen der für den Tierversuch zuständigen Behörde (LaGeSo) nicht möglich, da die Tiere nur einmal pro Woche in Narkose gelegt werden durften. Somit mussten Ergebnisse aus den Messungen im CT eine Woche nach Implantation (wie z.B. Durchmesser etc.) mit Funktionsmessungen aus dem ICE direkt nach Implantation verglichen werden. Mögliche Verfälschungen, z.B. der Ovalität, durch eine etwaige weitergehende Aufweitung des Stents während dieser Woche können dementsprechend nicht ausgeschlossen werden.

Durch die beim Schaf vom Menschen abweichende Thoraxform war eine transthorakale Echokardiographie in unserem Versuch nicht optimal möglich [56]. Wir verwendeten deshalb die intrakardiale Echokardiografie zur Erhebung von Funktionsparametern der Klappen. Hiermit ließen sich gute Ergebnisse erzielen. Dennoch könnte in Folgeversuchen eine Untersuchung der Tiere mittels MRT zu verschiedenen Follow-up Zeitpunkten von Vorteil sein. Das MRT stellt den Goldstandard zur Bestimmung der Insuffizienz dar. Die Regurgitationsfraktion ließe sich hier im Vergleich zur intrakardialen Echokardiographie präziser bestimmen [108]. Darüber hinaus könnten mit dieser Methode auch die Flussmuster distal der Pulmonalklappe analysiert werden, was wichtige Aufschlüsse über die Erzielung physiologischer hämodynamischer Strömungen liefern könnte.

4.4. Ausblick für weitere Studien

Die Daten dieser Studie konnten zeigen, dass eine minimalinvasive Implantation einer tissue-engineerten Herzklappe möglich ist. Die von Beginn an präsente und über das Follow-up zunehmende Insuffizienz der Klappen, macht jedoch Änderungen am Klappendesign für nachfolgende Versuche notwendig. Verbesserungsvorschläge am Klappendesign, die sich aus unserer Studie ergeben haben, lauten wie folgt:

Es sollte geprüft werden, ob die Verwendung von "Inserts" während der Bioreaktorphase Verwachsungen zu diesem Zeitpunkt vorbeugen könnte.

Dies würde der Reduktion der frei beweglichen Segelfläche entgegenwirken. Eine Verlängerung der Koaptationszone der Segel könnte in der Folge bewirkt werden um auch bei Aufweitung des Stents auf größere Durchmesser noch einen suffizienten Schluss zu ermöglichen.

Weiterhin könnte durch eine bauchigere Form der Segel der Tiefpunkt des Sinus von der Hinge Region auf das Segel verlagert werden. Daraus würde möglicherweise eine bessere Durchspülung der Hinge Region mit Blut resultieren und Verwachsungen von Segel und Konduit durch thrombotisches Material vermieden werden.

Wir sind optimistisch, dass die Umsetzung dieser Designänderungen eine Verbesserung der Klappenfunktionalität herbeiführen könnte.

Um das Ziel einer wachsenden Klappe umsetzen zu können, wäre es für weitere Arbeiten wichtig, einen biodegradierbaren Stent zu verwenden. Ein Bestehenbleiben des Stents wie in dieser Studie begrenzt ein potentiell Wachstum mechanisch. Ein

resorbierbarer Stent könnte idealerweise initial die Stabilität bieten, die für die Verwachsung der dTE-Klappe an den natürlichen Strukturen nötig ist, aber im Verlauf degenerieren, so dass ein Wachstum der dTE-Klappe mit den Nativstrukturen nicht eingeschränkt wird. Für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Klappen wäre die Verwendung eines noch wachsenden Tiermodells notwendig.

Anschließend wären längere präklinische Studien essentiell, um Langzeitergebnisse über die Durabilität zu generieren und ein eventuelles Wachstum der Klappe nachzuweisen.

Für die Katheterimplantation könnte eine Überarbeitung des Ablagesystems Vorteile bringen. Das Ablagesystem beinhaltet bisher noch keinen Rückhaltemechanismus für den Stent. Ein solcher könnte die Zielgenauigkeit der Klappenpositionierung verbessern, indem er ein ungewolltes Freisetzen des Stents verhindert. In Bezug auf die Implantationsprozedur könnte eine Bewegungsreduktion des Herzens durch Adenosin oder „Rapid right ventricular pacing“ zu einer verbesserten Positionierung der Stents beitragen.

Außerdem konnten wir zeigen, dass die Widerristhöhe der Tiere mit ihrem Pulmonalklappendurchmesser korrelierte. Dieser Zusammenhang könnte einen guten Parameter zur nicht-invasiven Abschätzung der Gefäßparameter darstellen. In Versuchen, in denen wie in unserer Studie nicht größenangepasster Stents verwendet werden, könnte somit der Einkauf der Tiere gezielt an die Bedürfnisse der Studie angepasst werden und Diskrepanzen zwischen Stentgröße und nativen Pulmonalklappendurchmesser verhindert werden. Dies würde letztlich zur Reduzierung von Tierversuchen beitragen.

4.5. Schlussfolgerung

Dieser Versuch beschreibt nach unserem Wissen die erstmalige transkutane Implantation einer klassisch tissue-engineerten und nachfolgend dezellularisierten Klappe über einen peripheren Venenzugang. Unsere Studie konnte Bearbeitungsbedarf insbesondere bezüglich der Regurgitation der Klappe aufzeigen. Wir lieferten Ansätze für eine Verbesserung des Klappendesigns, des Ablagesystems und der Implantationsprozedur, die die Funktionalität der Klappen in Zukunft verbessern sollten. Zufriedenstellende Ergebnisse lieferte unser Versuch bezüglich des Remodellings der Klappe. Insbesondere war ein gutes

Einwanderungsverhalten der Zellen in die Klappenstruktur, eine frühzeitig vollständige Endothelialisierung und eine ausbleibende Kalzifizierung der Klappe zu beobachten. Ein Wachstum der Klappe erscheint somit möglich. Weitere Untersuchungen mit dem von uns verwendeten Konzept unter Umsetzung der zuvor diskutierten Verbesserungsvorschläge erscheinen daher empfehlenswert.

5. Literaturverzeichnis

1. Harken D, Soroff H, Taylor W, Lefemine A, Gupta S, Lunzer S. Partial and complete prostheses in aortic insufficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1960;40:744.
2. Starr A, Edwards L. Mitral replacement: clinical experience with a ball-valve prosthesis. *Ann Surg.* 1961;154(4):726-740.
3. Ross D. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet.* 1962;2(7254):487.
4. Barratt-Boyes BG. Homograft Aortic Valve Replacement in Aortic Incompetence and Stenosis. *Thorax.* 1964;19(2):131-150.
5. Stamm C, Anderson R, Ho S. Clinical anatomy of the normal pulmonary root compared with that in isolated pulmonary valvular stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(6):1420-1425.
6. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus - Lernatlas der Anatomie. Innere Organe. 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2009:98-101.
7. Misfeld M, Sievers H. Heart valve macro- and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007;362(1484):1421-1436.
8. Lüllmann-Rauch R. Histologie. 5th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015: 293.
9. Riem Vis P, Kluin J, Sluijter J, van Herwerden L, Bouten C. Environmental regulation of valvulogenesis: implications for tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011;39(1):8-17.
10. Scott M, Vesely I. Aortic valve cusp microstructure: the role of elastin. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(2 Suppl):391-394.
11. Henaine R, Roubertie F, Vergnat M, Ninet J. Valve replacement in children: A challenge for a whole life. *Arch Cardiovasc Dis.* 2012;105(10):517-528.
12. Stark J. The use of valved conduits in pediatric cardiac surgery. *Pediatr Cardiol.* 1998;19(4):282 - 288.
13. Bouzas B, Kilner P, Gatzoulis M. Pulmonary regurgitation: not a benign lesion. *Eur Heart J.* 2005;26(5):433-439.
14. Gatzoulis M, Balaji S, Webber S, Siu S, Hokanson J, Poile C, Rosenthal M, Nakazawa M, Moller J, Gillette P, Webb G, Redington A. Risk factors for

- arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot: a multicentre study. *Lancet*. 2000;356(9234):975-981.
15. Dave H, Buechel E, Dodge-Khatami A, Kadner A, Rousson V, Bauersfeld U, Prêtre R. Early insertion of a pulmonary valve for chronic regurgitation helps restoration of ventricular dimensions. *Ann Thorac Surg*. 2005;80(5):1615-1621.
 16. Frigiola A, Tsang V, Bull C, Coats L, Khambadkone S, Derrick G, Mist B, Walker F, van Doorn C, Bonhoeffer P, Taylor A. Biventricular response after pulmonary valve replacement for right ventricular outflow tract dysfunction: is age a predictor of outcome? *Circulation*. 2008;118(14 Suppl):182-190.
 17. Lee C, Jacobs J, Lee C, Kwak J, Chai P, Quintessenza J. Surgical pulmonary valve insertion – when, how, and why. *Cardiol Young*. 2013;22(06):702-707.
 18. Ringewald J, Suh E. Transcatheter pulmonary valve insertion: when, how, and why. *Cardiol Young*. 2013;22(06):696-701.
 19. Emami S. Options for prosthetic pulmonary valve replacement. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*. 2012;15(1):34-37.
 20. Bloomfield P. Choice of Heart Valve Prosthesis. *Heart*. 2002;87:583-589.
 21. Salem D, O'Gara P, Madias C, Pauker S. Valvular and Structural Heart Disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition) *Chest*. 2008;133(6 Suppl):593S-629S.
 22. Rosti L, Murzi B, Colli A, Festa P, Redaelli S, Havelova L, Menicanti L, Frigiola A. Mechanical valves in the pulmonary position - a reappraisal. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;115(5):1074-1079.
 23. Cannegieter S, Rosendaal F, Briet E. Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses. *Circulation*. 1994;89(2):635-641.
 24. Hammermeister K, Sethi G, Henderson W, Rahimtoola S. Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(4):1152-1158.
 25. Lee C, Park C, Lee C, Kwak J, Kim S, Shim W, Song J, Choi E, Lee S. Durability of bioprosthetic valves in the pulmonary position: Long-term follow-up of 181 implants in patients with congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;142(2):351-358.

26. Clarke D, Bishop D. Allograft degeneration in infant pulmonary valve allograft recipients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1993;7(7):365-370.
27. Schoen F, Levy R. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(3):1072-1080.
28. Madershahian N, Franke U, Strauch J, Wahlers T. Der Einsatz von menschlichen Herzklappen („Homografts“) in der Therapie von Herzklappenerkrankungen - Eine Übersicht. *Z Herz-Thorax- Gefäßschir.* 2005;19(3):101-108.
29. Neuenschwander S, Hoerstrup S. Heart valve tissue engineering. *Transpl Immunol.* 2004;12(3-4):359-365.
30. 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.* 2000;356(9239):1403-1405.
31. McElhinney D, Hennesen J. The Melody® valve and Ensemble® delivery system for transcatheter pulmonary valve replacement. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1291(1):77-85.
32. Bauner K, Kozlik-Feldmann R. Minimal-invasiver Pulmonalklappenersatz bei pädiatrischen Patienten. *Radiologe.* 2013;53(10):880-885.
33. Cheatham JP, Hellenbrand WE, Zahn EM, Jones TK, Berman DP, Vincent JA, McElhinney DB. Clinical and hemodynamic outcomes up to 7 years after transcatheter pulmonary valve replacement in the US melody valve investigational device exemption trial. *Circulation.* 2015;131(22):1960-1970.
34. Eicken A, Ewert P, Hager A, Peters B, Fratz S, Kuehne T, Busch R, Hess J, Berger F. Percutaneous pulmonary valve implantation: two-centre experience with more than 100 patients. *Eur Heart J.* 2011;32(10):1260-1265.
35. McElhinney D, Hellenbrand W, Zahn E, Jones T, Cheatham J, Lock J, Vincent J. Short- and medium-term outcomes after transcatheter pulmonary valve placement in the expanded multicenter US melody valve trial. *Circulation.* 2010;122(5):507-516.
36. Khambadkone S, Bonhoeffer P. Nonsurgical pulmonary valve replacement: Why, when, and how? *Catheter Cardiovasc Interv.* 2004;62(3):401-408.

37. Boone R, Webb J, Horlick E, Benson L, Cao Q, Nadeem N, Kiess M, Hijazi Z. Transcatheter pulmonary valve implantation using the Edwards SAPIEN™ transcatheter heart valve. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2010;75(2):286-294.
38. Ewert P, Horlick E, Berger F. First implantation of the CE-marked transcatheter Sapien pulmonic valve in Europe. *Clin Res Cardiol.* 2010;100(1):85-87.
39. Kiefer P, Gruenwald F, Kempfert J, Aupperle H, Seeburger J, Mohr F, Walther T. Crimping may affect the durability of transcatheter valves: an experimental analysis. *Ann Thorac Surg.* 2011;92(1):155-160.
40. Zegdi R, Bruneval P, Blanchard D, Fabiani J. Evidence of leaflet injury during percutaneous aortic valve deployment. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011;40(1):257-259.
41. Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920 - 926.
42. Elkins R. Is tissue-engineered heart valve replacement clinically applicable? *Carr Cardiol Rep.* 2003;5(2):125 - 128.
43. Dohmen P, da Costa F, Holinski S, Lopes S, Yoshi S, Reichert L, Villani R, Posner S, Konertz W. Is There a Possibility for a Glutaraldehyde-Free Porcine Heart Valve to Grow? *Euro Surg Res.* 2006;38(1):54-61.
44. Konertz W, Dohmen P, Liu J, Beholz S, Dushe S, Posner S, Lembcke A, Erdbrügger W. Hemodynamic characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation. *J Heart Valve Dis.* 2005;14(1):78-81.
45. Perri G, Polito A, Esposito C, Albanese S, 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.* 2012;41(6):1320-1325.
46. Ruffer A, Purbojo A, Cicha I, Glockler M, Potapov S, Dittrich S, Cesnjevar R. Early failure of xenogenous de-cellularised pulmonary valve conduits - a word of caution! *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010;38(1):78-85.
47. Voges I, Brasen J, Entenmann A, Scheid M, Scheewe J, Fischer G, Hart C, Andrade A, Pham H, Kramer H, Rickers C. Adverse results of a decellularized tissue-engineered pulmonary valve in humans assessed with magnetic resonance imaging. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2013;44(4):e272-e279.

48. Auto Tissue Berlin GmbH. Dezellularisierte Pulmonalklappe mit montiertem Patch - Information für Ärzte und Wissenschaftler. 2014. (Accessed February 6th, 2014, at <http://www.autotissue.de/uploads/media/AErztebroschuere.pdf>.)
49. Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Batrinac A, Kleczka C, Ciubotaru A, Haverich A. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation*. 2002;106(12 Suppl 1):I-63 - I-68.
50. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Suprunov M, Tudorache G, Goerler H, Park J, 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 Suppl):I559-565.
51. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss R, Pethig K, Haverich A, Bader A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits : in vivo restoration of valve tissue. *Circulation*. 2000;102(3 Suppl):III-50-III-55.
52. Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, Hilfiker A, Mertsching H, Leyh R, Breymann T, Kallenbach K, Maniuc L, Batrinac A, Repin O, Maliga O, Ciubotaru A, Haverich A. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I132-137.
53. Patience C, Takeuchi Y, Weiss R. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med*. 1997;3(3):282-286.
54. Moza A, Mertsching H, Herden T, Bader A, Haverich A. Heart valves from pigs and the porcine endogenous retrovirus: experimental and clinical data to assess the probability of porcine endogenous retrovirus infection in human subjects. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;121(4):697-701.
55. Shinoka T, Breuer C, Tanel R, Zund G, Miura T, Ma P, Langer R, Vacanti J, Mayer J. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(6 Suppl):513-516.
56. Gottlieb D, Kunal T, Emani S, Aikawa E, Brown D, Powell A, Nedder A, Engelmayer GJ, Melero-Martin J, Sacks M, Mayer JJ. In vivo monitoring of function of autologous engineered pulmonary valve. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(3):723-731.

57. Hoerstrup S, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha E, Martin D, Moran A, Guleserian K, Sperling J, Kaushal S, Vacanti J, Schoen F, Mayer J. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation*. 2000;102(Suppl III):III-44-III-49.
58. Flanagan T, Sachweh J, Frese J, Schnöring H, Gronloh N, Koch S, Tolba R, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S. In vivo remodeling and structural characterization of fibrin-based tissue-engineered heart valves in the adult sheep model. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(10):2965-2976.
59. Sutherland F, Perry T, Yu Y, Sherwood M, Rabkin E, Masuda Y, Garcia G, McLellan D, Engelmayer GJ, Sacks M, Schoen F, Mayer JJ. From stem cells to viable autologous semilunar heart valve. *Circulation*. 2005;111(21):2783-2791.
60. Mol A, Rutten M, Driessen N, Bouten C, Zund G, Baaijens F, Hoerstrup S. Autologous human tissue-engineered heart valves: prospects for systemic application. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I152-158.
61. Rabkin E, Hoerstrup S, Aikawa E, Mayer J, Schoen F. Evolution of cell phenotype and extracellular matrix in tissue-engineered heart valves during in-vitro maturation and in-vivo remodeling. *J Heart Valve Dis*. 2002;11(3):308-314.
62. Schmidt D, Hoerstrup S. Tissue engineered heart valves based on human cells. *Swiss Med Weekly*. 2005;135:618 - 623.
63. Schnell A, Hoerstrup S, Zund G, Kolb S, Sodian R, Visjager J, Grunenfelder J, Suter A, Turina M. Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;49(4):221 - 225.
64. Dijkman P, Driessen-Mol A, Frese L, Hoerstrup S, Baaijens F. Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts. *Biomaterials*. 2012;33(18):4545-4554.
65. Weber B, Dijkman P, Scherman J, Sanders B, Emmert M, Grünenfelder J, Verbeek R, Bracher M, Black M, Franz T, Kortsmid J, Modregger P, Peter S, Stampanoni M, Robert J, Kehl D, van Doeselaar M, Schweiger M, Brokopp C, Wälchli T, Falk V, Zilla P, Driessen-Mol A, Baaijens F, Hoerstrup S. Off-the-shelf human decellularized tissue-engineered heart valves in a non-human primate model. *Biomaterials*. 2013;34(30):7269-7280.

66. Emmert M, Weber B, Wolint P, Behr L, Sammut S, Frauenfelder T, Frese L, Scherman J, Brokopp C, Templin C, Grunenfelder J, Zund G, Falk V, Hoerstrup S. Stem cell-based transcatheter aortic valve implantation: first experiences in a pre-clinical model. *JACC Cardiovasc Interv.* 2012;5(8):874-883.
67. Metzner A, Stock U, Iino K, Fischer G, Huemme T, Boldt J, Braesen J, Bein B, Renner J, Cremer J, Lutter G. Percutaneous pulmonary valve replacement: autologous tissue-engineered valved stents. *Cardiovasc Res.* 2010;88(3):453-461.
68. Ali ML, Kumar SP, Bjornstad K, Duran CMG. The sheep as an animal model for heart valve research. *Cardiovasc Surg.* 1996;4(4):543-549.
69. Hoerstrup S, Cummings MI, Lachat M, Schoen F, Jenni R, Leschka S, Neuenschwander S, Schmidt D, Mol A, Günter C, Gössi M, Genoni M, Zund G. Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: follow-up at 100 weeks in a large animal model. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):I-159-I-166.
70. Alsoufi B, Manlhiot C, McCrindle BW, Canver CC, Sallehuddin A, Al-Oufi S, Joufan M, Al-Halees Z. Aortic and mitral valve replacement in children: is there any role for biologic and bioprosthetic substitutes? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009;36(1):84-90; discussion 90.
71. Rippel R, Ghanbari H, Seifalian A. Tissue-engineered heart valve: future of cardiac surgery. *World J Surg.* 2012;36(7):1581-1591.
72. Bartosch M, Peters H, Spriestersbach H, D OHI, Berger F, Schmitt B. A Universal Delivery System for Percutaneous Heart Valve Implantation. *Ann Biomed Eng.* 2016;44(9):2683-2694.
73. Driessen-Mol A, Emmert M, Dijkman P, Frese L, Sanders B, Weber B, Cesarovic N, Sidler M, Leenders J, Jenni R, Grünenfelder J, Falk V, Baaijens F, Hoerstrup S. 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.* 2014;63(13):1320-1329.
74. Mol A, Driessen N, Rutten M, Hoerstrup S, Bouten C, Baaijens F. Tissue Engineering of Human Heart Valve Leaflets: A Novel Bioreactor for a Strain-

- Based Conditioning Approach. *Annals of Biomedical Engineering*. 2005;33(12):1778-1788.
75. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, lung B, Otto CM, Pellikka PA, Quinones M, American Society of E, European Association of E. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *J Am Soc Echocardiogr*. 2009;22(1):1-23; quiz 101-102.
 76. Lancellotti P, Tribouilloy C, Hagendorff A, Moura L, Popescu B, Agricola E, Monin J, Pierard L, Badano L, Zamorano J, Sicari R, Vahanian A, Roelandt J. European Association of Echocardiography recommendations for the assessment of valvular regurgitation. Part 1: aortic and pulmonary regurgitation (native valve disease). *Euro J Echocardiogr*. 2010;11(3):223-244.
 77. Tribouilloy C, Enriquez-Sarano M, Bailey K, Tajik A, Seward J. Quantification of tricuspid regurgitation by measuring the width of the vena contracta with Doppler color flow imaging: a clinical study. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(2):472 - 478.
 78. Lima C, Sahn D, Vealdez-Cruz L, Goldberg S, Barron J, Allen H, Grenadier E. Noninvasive prediction of transvalvular pressure gradient in patients with pulmonary stenosis by quantitative two-dimensional echocardiographic Doppler studies. *Circulation*. 1983;67(4):866 - 871.
 79. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol*. 1982;11(4):318-326.
 80. Quentin T, Poppe A, Bär K, Sigler A, Foth, Michel-Behnke I, Paul T, Sigler M. A novel method for processing resin-embedded specimens with metal implants for immunohistochemical labelling. *Acta Histochem*. 2009;111(6):538-542.
 81. Hoffman J. Incidence of congenital heart disease: I. postnatal incidence. *Pediatr Cardiol*. 1995;16(3):103-113.
 82. Nordmeyer J, Coats L, Lurz P, Lee T, Derrick G, Rees P, Cullen S, Taylor A, Khambadkone S, Bonhoeffer P. Percutaneous pulmonary valve-in-valve implantation: a successful treatment concept for early device failure. *Eur Heart J*. 2008;29(6):810-815.

83. Attmann T, Quaden R, Jahnke T, Muller-Hulsbeck S, Boening A, Cremer J, Lutter G. Percutaneous Pulmonary Valve Replacement: 3-Month Evaluation of Self-Expanding Valved Stents. *Ann Thorac Surg.* 2006;82(2):708-713.
84. Amahzoune B, Bruneval P, Allam B, Lafont A, Fabiani JN, Zegdi R. Traumatic leaflet injury during the use of percutaneous valves: a comparative study of balloon- and self-expandable valved stents. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012;43(3):488-493.
85. Attmann T, Jahnke T, Quaden R, Boening A, Muller-Hulsbeck S, Cremer J, Lutter G. Advances in Experimental Percutaneous Pulmonary Valve Replacement. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(3):969-975.
86. Attmann T, Lutter G, Quaden R, Jahnke T, Rumberg K, Cremer J, Muller-Hulsbeck S. Percutaneous Valve Replacement: Significance of Different Delivery Systems In Vitro and In Vivo. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2006;29(3):406-412.
87. Schmidt D, Dijkman P, Driessen-Mol A, Stenger R, Mariani C, Puolakka A, Rissanen M, Deichmann T, Odermatt B, Weber B, Emmert M, Zund G, Baaijens F, Hoerstrup S. Minimally-invasive implantation of living tissue engineered heart valves: a comprehensive approach from autologous vascular cells to stem cells. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(6):510-520.
88. Dijkman P, Driessen-Mol A, de Heer L, Kluin J, van Herwerden L, Odermatt B, Baaijens F, Hoerstrup S. Trans-apical versus surgical implantation of autologous ovine tissue-engineered heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2012;21(5):670-678.
89. Faza N, Kenny D, Kavinsky C, Amin Z, Heitschmidt M, Hijazi Z. Single-center comparative outcomes of the edwards SAPIEN and medtronic melody transcatheter heart valves in the pulmonary position. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2013;82(4):E535-541.
90. Lutter G, Metzner A, Jahnke T, Bombien R, Boldt J, Iino K, Cremer J, Stock U. Percutaneous tissue-engineered pulmonary valved stent implantation. *Ann Thorac Surg.* 2010;89(1):259-263.
91. Medtronic I. The Valiant Thoracic Stent Graft with the Captivia Delivery System. 2013. (Accessed January 8th, 2014, at <http://www.aortic.medtronicendovascular.com/us/valiant-captivia/overview/index.htm>.)

92. Manoharan G, Walton AS, Brecker SJ, Pasupati S, Blackman DJ, Qiao H, Meredith IT. Treatment of Symptomatic Severe Aortic Stenosis With a Novel Resheathable Supra-Annular Self-Expanding Transcatheter Aortic Valve System. *JACC Cardiovasc Interv.* 2015;8(10):1359-1367.
93. Sinning JM, Werner N, Nickenig G, Grube E. Medtronic CoreValve Evolut R with EnVeo R. *EuroIntervention.* 2013;9 Suppl:S95-96.
94. Davidavicius G, Chieffo A, Shannon J, Arioli F, Ielasi A, Mussardo M, Maisano F, Montorfano M, Godino C, Latib A, Colombo A. A high dose of adenosine to induce transient asystole for valvuloplasty in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation (TAVI): Is it a valid alternative to rapid pacing? A prospective pilot study. *J Invasive Cardiol.* 2011;23(11):467-471.
95. Kahn R, Moskowitz D, Marin M, Hollier L, Parsons R, Teodorescu V, McLaughlin M. Safety and efficacy of high-dose adenosine-induced asystole during endovascular AAA repair. *J Endovasc Ther.* 2000;7(4):292–296.
96. Reimer J, Syedain Z, Haynie B, Lahti M, Berry J, Tranquillo R. Implantation of a Tissue-Engineered Tubular Heart Valve in Growing Lambs. *Ann Biomed Eng.* 2016.
97. Kuetting M, Sedaghat A, Utzenrath M, Sinning J, Schmitz C, Roggenkamp J, Werner N, Schmitz-Rode T, Steinseifer U. In vitro assessment of the influence of aortic annulus ovality on the hydrodynamic performance of self-expanding transcatheter heart valve prostheses. *Journal Biomech.* 2014;47(5):957-965.
98. van Vlimmeren M, Driessen-Mol A, Oomens C, Baaijens F. Passive and active contributions to generated force and retraction in heart valve tissue engineering. *Biomech Model Mechanobiol.* 2012;11(7):1015-1027.
99. van Vlimmeren M, Driessen-Mol A, Oomens C, Baaijens F. An in vitro model system to quantify stress generation, compaction and retraction in engineered heart valve tissue. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17(10):983-991.
100. Quinn R, Hilbert S, Bert A, Drake B, Bustamante J, Fenton J, Moriarty S, Neighbors S, Lofland G, Hopkins R. Performance and morphology of decellularized pulmonary valves implanted in juvenile sheep. *Ann Thorac Surg.* 2011;92(1):131-137.
101. van Loosdregt I, Argento G, Driessen-Mol A, Oomens C, Baaijens F. Cell-mediated retraction versus hemodynamic loading - A delicate balance in tissue-engineered heart valves. *J Biomech.* 2013;47(9):2064-2069.

102. Sanders B, Loerakker S, Fioretta ES, Bax DJ, Driessen-Mol A, Hoerstrup SP, Baaijens FP. Improved Geometry of Decellularized Tissue Engineered Heart Valves to Prevent Leaflet Retraction. *Ann Biomed Eng.* 2015.
103. Levine A, Miller P, Stumper O, Wright J, Silove E, De Giovanni J, Sethia B, Brawn W. Early results of right ventricular-pulmonary artery conduits in patients under 1 year of age. *Euro J Cardiothorac Surg.* 2001;19(2):122-126.
104. Hellberg K, Ruschewski W, de Vivie E. Early stenosis and calcification of glutaraldehyd-preserved porcine xenografts in children. *Thorac cardiovasc Surg.* 1981;29(6):369-374.
105. Bertels R, Dalinghaus M, Witsenburg M, Nijveld A, Bogers A, Meijboom F, van Oort A, Tanke R. Results of balloon dilatation of stenotic homografts in pulmonary position in children and young adults. *Cardiol Young.* 2012;22(5):589-595.
106. Hall A, Miga D, Leonard G, Wang H, Kavey R, Alfieris G. Percutaneous balloon dilation of Carpentier-Edwards porcine-valved right ventricle-to-pulmonary artery conduits. *Pediatr Cardiol.* 2012;34(4):978-983.
107. Leyh R, Wilhelmi M, Rebe P, Fischer S, Kofidis T, Haverich A, Mertsching H. In vivo repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(5):1457-1463.
108. Mercer-Rosa L, Yang W, Kutty S, Rychik J, Fogel M, Goldmuntz E. Quantifying pulmonary regurgitation and right ventricular function in surgically repaired tetralogy of Fallot: a comparative analysis of echocardiography and magnetic resonance imaging. *Circ Cardiovas Imaging.* 2012;5(5):637-643.

6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Torben Radtke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „In vivo Evaluation und Histologie minimalinvasiv implantierter tissue-engineerter Pulmonalklappen im Schafsmodell“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

7. Anteilserklärung

Torben Radtke hatte folgenden Anteil an den folgenden Veröffentlichungen:

Publikationen

Spriestersbach H, Prudlo A, Bartosch M, Sanders B, **Radtke T**, Baaijens FP, Hoerstrup SP, Berger F, Schmitt B. 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. *Cardiovasc Interv Ther*. 2016 May 2. [Epub ahead of print]

Eigener Anteil: Histologische Analyse der Präparate, statistische Aufarbeitung und Auswertung der Daten, Erstellung von Tabellen und Grafiken für das Paper, Literaturrecherche

Schmitt B, Spriestersbach H, O H-Icí D, **Radtke T**, Bartosch M, Peters H, Sigler M, Frese L, Dijkman PE, Baaijens FP, Hoerstrup SP, Berger F. Percutaneous pulmonary valve replacement using completely tissue-engineered off-the-shelf heart valves: six-month in vivo functionality and matrix remodelling in sheep. *EuroIntervention*. 2016 May 17;12(1):62-70. doi: 10.4244/EIJV12I1A12.

Eigener Anteil: Mitarbeit an den Tierversuchen, histologische Analyse der Präparate, Aufarbeitung der Daten sowie Durchführung der statistischen Analysen, Interpretation der Ergebnisse, Erstellung von Tabellen und Grafiken für das Paper, Literaturrecherche, Editierung des Manuskriptes

Vorträge und Postervorstellungen

H. Priestersbach, B. Sanders, E. Fioretta, L. Bruder, D. Oh-Ici, **T. Radtke**, M. Bartosch, H. Peters, K. Brakmann, M. Sigler, L. Frese, P.E. Dijkman, F.P.T. Baaijens, S.P. Hoerstrup, F. Berger, B. Schmitt. Up to One Year In Vivo Functionality of Transvenously-Implanted Tissue-Engineered Pulmonary Heart Valves in Sheep. Thorac cardiovasc Surg. 2015; 63 - V0020. DOI: 10.1055/s-0035-1555976

Vortrag auf der 47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), 6.-9.Juni 2015, Weimar, Deutschland.

Eigener Anteil: Mitarbeit an den Tierversuchen, Aufbereitung sowie Auswertung und Interpretation der Daten inkl. statistischer Analysen

T. Radtke, H. Priestersbach, B. Sanders, E. Fioretta, D. Oh-Ici, M. Bartosch, H. Peters, K. Brakmann, M. Sigler, L. Frese, P.E. Dijkman, F.P.T. Baaijens, S.P. Hoerstrup, F. Berger, B. Schmitt. In vivo evaluation and histology of minimally invasively implanted tissue-engineered heart valves in sheep. Poster-Präsentation und Vortrag auf der 26. ESC Conference, 23. – 26. September 2015, Berlin, Deutschland

Im Rahmen hiervon: Auszeichnung mit dem Preis für die beste Posterpräsentation in der Kategorie „Pädiatrie“ und dem „Science Open Poster Award“ für eines der 20 besten Poster der Konferenz.

Eigener Anteil: Mitarbeit an den Tierversuchen, histologische Analyse der Präparate, Aufarbeitung der Daten sowie Durchführung der statistischen Analysen, Interpretation der Ergebnisse, Erstellung von Grafiken für das Poster, Literaturrecherche, Verfassung des Postertextes, Posterpräsentation an zwei Tagen sowie öffentlicher Vortrag inkl. Power Point Präsentation.

Datum

Unterschrift

8. Lebenslauf

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

9. Publikationsliste

Publikationen

1. Spriestersbach H, Prudlo A, Bartosch M, Sanders B, **Radtke T**, Baaijens FP, Hoerstrup SP, Berger F, Schmitt B. 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. *Cardiovasc Interv Ther*. 2016 May 2. [Epub ahead of print]
2. Schmitt B, Spriestersbach H, O H-Icí D, **Radtke T**, Bartosch M, Peters H, Sigler M, Frese L, Dijkman PE, Baaijens FP, Hoerstrup SP, Berger F. Percutaneous pulmonary valve replacement using completely tissue-engineered off-the-shelf heart valves: six-month in vivo functionality and matrix remodelling in sheep. *EuroIntervention*. 2016 May 17;12(1):62-70. doi: 10.4244/EIJV12I1A12.

Vorträge und Postervorstellungen

1. H. Spriestersbach, B. Sanders, E. Fioretta, L. Bruder, D. Oh-Icí, **T. Radtke**, M. Bartosch, H. Peters, K. Brakmann, M. Sigler, L. Frese, P.E. Dijkman, F.P.T. Baaijens, S.P. Hoerstrup, F. Berger, B. Schmitt. Up to One Year In Vivo Functionality of Transvenously-Implanted Tissue-Engineered Pulmonary Heart Valves in Sheep. *Thorac cardiovasc Surg*. 2015; 63 - V0020. DOI: 10.1055/s-0035-1555976
Vortrag auf der 47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), 6.-9.Juni 2015, Weimar, Deutschland.
2. **T. Radtke**, H. Spriestersbach, B. Sanders, E. Fioretta, D. Oh-Icí, M. Bartosch, H. Peters, K. Brakmann, M. Sigler, L. Frese, P.E. Dijkman, F.P.T. Baaijens, S.P. Hoerstrup, F. Berger, B. Schmitt. In vivo evaluation and histology of minimally invasively implanted tissue-engineered heart valves in sheep. Poster-Präsentation und Vortrag auf der 26. ESC Conference, 23. – 26. September 2015, Berlin, Deutschland

Im Rahmen hiervon: Auszeichnung mit dem Preis für die beste Posterpräsentation in der Kategorie „Pädiatrie“ und dem „Science Open Poster Award“ für eines der 20 besten Poster der Konferenz.

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Felix Berger danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Leitung anfertigen zu dürfen und für die freundliche Aufnahme in seine Klinik.

Großen Dank schulde ich Herrn Dr. Boris Schmitt für die Vergabe des Themas, die intensive Betreuung, die Korrektur- und Verbesserungsvorschläge zu dieser Arbeit und vor allem aber auch für die netten Gespräche und die tolle Zeit, die ich im Rahmen dieses Projektes in der Arbeitsgruppe verbringen durfte.

Der gesamten Gruppe von Life-Valve bin ich dankbar für die herzliche Aufnahme in das Team und die fächerübergreifenden Diskussionen und Hilfestellungen. Im Speziellen danke ich Herrn Dr. Hendrik Spristersbach für die Zusammenarbeit bei der Analyse der Daten, Herrn Marco Bartosch für das Korrekturlesen des technischen Teils der Arbeit sowie Frau Katharina Weber und Herrn Stefan Schröder für die Hilfe bei administrativen Aufgaben.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Matthias Sigler für die Unterstützung und die Diskussionen im Rahmen der histologischen Auswertung.

Darüber hinaus möchte ich den Partnern und Förderern des Projektes „Life Valve“ für die gute Zusammenarbeit, den intensiven Austausch und die Finanzierung danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Laura Hanne, für das wiederholte Korrekturlesen, die konstruktiven Verbesserungsvorschläge, vor allem aber für das aufmunternde Zusprechen gerade in Zeiten, in denen die Arbeit einmal nicht so locker von der Hand gehen wollte.

Meinem Bruder Jorma danke ich für die Hilfe bei der Erstellung einiger Grafiken.

Zuletzt danke ich meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung von Beginn an sowie für die aufmunternden Worte, wenn diese nötig waren, und für ihre liebevolle Art mir immer zur Seite zu stehen.