

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

DISSERTATION

In-vivo-Funktionalität transvenös implantierter, dezellularisierter, tissue
engineerter Pulmonalklappen im Großtiermodell über ein Jahr

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

vorgelegt der medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leon Bruder
aus Heidelberg

Datum der Promotion: 04.06.2021

Vorwort

Teile der in dieser Arbeit dargestellten Daten wurden bereits vorab im Rahmen von Publikationen und Kongressbeiträgen veröffentlicht. Die präsentierten Daten sind daher teilweise kongruent zu folgenden Veröffentlichungen:

- Maximilian Y. Emmert, MD, PhD, Boris A. Schmitt, MD, Sandra Loerakker, PhD, Bart Sanders, PhD, Hendrik Spriestersbach, MD, Emanuela Fioretta, PhD, Leon Bruder, Kerstin Brakmann, VS, Petra Dijkman, PhD, Laura Frese, PhD, Felix Berger, MD, Frank Baaijens, PhD, Simon P. Hoerstrup, MD, PhD:
Computational modeling guides tissue-engineered heart valve design for long-term in vivo performance in a translational sheep model.
Science Translational Medicine, 2018.
- Leon Bruder, Hendrik Spriestersbach, Marco Bartosch, Kerstin Brakmann, Bart Sanders, Sandra Loerakker, Frank Baaijens, Petra E. Dijkman, Laura Frese, Maximilian Emmert, Simon Hoerstrup, Felix Berger and Boris Schmitt:
Breakthrough one-year functionality of transvenously implanted, decellularized tissue-engineered pulmonary heart valves (dTEHV) in a sheep model.
Vortrag auf der 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), 17.-20. Februar 2018, Leipzig, Deutschland.
- Leon Bruder, Hendrik Spriestersbach, Marco Bartosch, Kerstin Brakmann, Bart Sanders, Frank Baaijens, Simon Hoerstrup, Felix Berger and Boris Schmitt.
One-year functionality of transvenously implanted, decellularized tissue-engineered pulmonary heart valves (dTEHV) in a sheep model.
Poster-Präsentation und Vortrag auf der 28. ESC, 27. – 30. September 2017, Berlin, Deutschland.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| Abbildungsverzeichnis | 7 |
| Tabellenverzeichnis | 8 |
| Zusammenfassung der Arbeit | 9 |
| Abstract | 10 |
| 1 Einleitung | 11 |
| 1.1 Pulmonalklappe: Anatomie und Physiologie | 11 |
| 1.2 Angeborene Herzklappendefekte | 13 |
| 1.3 Aktuell eingesetzte Klappenprothesen | 14 |
| 1.4 Minimalinvasiver Klappenersatz | 15 |
| 1.5 Tissue Engineering | 16 |
| 1.5.1 Tissue engineerete Herzklappen | 17 |
| 1.6 Schaf als Modell | 19 |
| 1.7 LifeValve | 20 |
| 1.8 Fragestellung | 21 |
| 2 Methoden | 23 |
| 2.1 Klappe & Stent | 23 |
| 2.2 Katheter | 26 |
| 2.3 Tiere und Haltung | 27 |
| 2.4 Studienprotokoll | 28 |
| 2.5 Lagerung während der Eingriffe | 29 |
| 2.6 Anästhesie | 29 |
| 2.7 Implantation | 30 |
| 2.8 CT | 31 |
| 2.9 Follow-up | 32 |
| 2.9.1 Intrakardialer Ultraschall (ICE) | 32 |
| 2.9.2 Magnetresonanztomographie (MRT) | 33 |
| 2.10 Explantation | 35 |
| 2.10.1 Explantationszeitpunkte | 35 |
| 2.10.2 Explantationsprozedur | 35 |
| 2.11 Makroskopische Begutachtung | 36 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.12 | Histologie | 36 |
| 2.13 | Statistik | 37 |
| 2.14 | Tierschutz & Ethik | 38 |
| 3 | Ergebnisse | 39 |
| 3.1 | Implantation | 39 |
| 3.1.1 | Eigenschaften der Tiere und verwendete Materialien | 40 |
| 3.1.2 | Implantationsprozedur | 40 |
| 3.1.3 | Initiale Klappenfunktion | 41 |
| 3.2 | Follow-up | 43 |
| 3.2.1 | Computertomographie | 43 |
| 3.2.2 | Druckmessungen | 46 |
| 3.2.3 | MRT | 47 |
| 3.2.3.1 | Flussmessungen | 48 |
| 3.2.3.2 | Volumetrie | 51 |
| 3.2.4 | Intrakardialer Ultraschall | 53 |
| 3.2.4.1 | PISA | 53 |
| 3.2.4.2 | Vena Contracta | 54 |
| 3.2.4.3 | Flussgeschwindigkeit | 57 |
| 3.2.4.4 | Insuffizienzgrade | 57 |
| 3.2.4.5 | Koaptation | 58 |
| 3.3 | Explantation | 59 |
| 3.4 | Makroskopie | 60 |
| 3.5 | Histologie | 66 |
| 3.5.1 | Endothelialisierung und Einwachsen | 66 |
| 3.5.2 | Neovaskularisierung | 67 |
| 3.5.3 | Gewebe und Zellen | 67 |
| 3.5.4 | Entzündungsreaktion | 68 |
| 3.5.5 | Verkalkung | 69 |
| 3.5.6 | Thromben und Nekrosen | 70 |
| 4 | Diskussion | 72 |
| 4.1 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 72 |
| 4.2 | Lernkurve | 73 |
| 4.3 | Vergleich mit aktuellen Studien | 74 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.3.1 | Defekte | 74 |
| 4.3.2 | Stenosierung | 75 |
| 4.3.3 | Zentrale Insuffizienzen | 75 |
| 4.3.4 | Kalzifizierungen | 77 |
| 4.3.5 | In-vivo Monitoring der Klappenfunktion | 78 |
| 4.3.6 | Methodenvergleich | 79 |
| 4.3.7 | Andere experimentelle Ansätze zum Herzklappenersatz | 83 |
| 4.4 | Vergleich zur ersten Generation | 85 |
| 4.5 | Remodeling-Prozess | 88 |
| 4.6 | Limitationen | 93 |
| 4.7 | Ausblick | 95 |
| 4.8 | Schlussfolgerung | 97 |
| 5 | Literaturverzeichnis | 98 |
| 6 | Eidesstattliche Versicherung | 109 |
| 7 | Anteilerklärung | 110 |
| 8 | Lebenslauf | 112 |
| 9 | Publikationsliste | 114 |
| 10 | Danksagung | 115 |

Abkürzungsverzeichnis

ca. = circa CT = Computertomographie

CW = continuous wave

dTEHV = dezellularisierte, tissue engineerte Herzklappe

EKG = Elektrokardiogramm

ERO = effektive Öffnungsfläche

EZM = extrazelluläre Matrix

Fr = French (medizinische Maßeinheit. 1Fr = 1 Charrière = $\frac{1}{3}$ mm)

g = Gramm

h = Stunde

ICE = intrakardiale Echokardiographie

IE = internationale Einheiten

i.m. = intramuskulär

i.v. = intravenös

kg = Kilogramm

KG = Körpergewicht

mg = Milligramm

ml = Milliliter

mm = Millimeter

mM = millimolar

mmHg = Torr (Millimeter Quecksilbersäule)

MRT = Magnetresonanztomographie

O₂ = Sauerstoff

PA = Pulmonalarterie

PvMaxPG = maximaler Druckgradient im pulsed wave-Doppler

PvMeanPG = mittlerer Druckgradient im pulsed wave-Doppler

PvVmax = maximale Flussgeschwindigkeit im pulsed wave-Doppler

RF = Regurgitationsfraktion

RVOT = rechtsventrikulärer Ausflusstrakt

s.c. = subkutan

SD = Standardabweichung

SMA = smooth muscle actin (glattes Muskelaktin)

s.o. = siehe oben

s.u. = siehe unten

TEHV = tissue engineerte Herzklappe

TIVA = totale intravenöse Anästhesie

U = Units

vgl. = vergleiche

vs. = versus

µm = Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Graphische Darstellung der Pulmonalklappe. _____ | 12 |
| Abbildung 2: Grundlegende Mechanismen des Tissue Engineerings. _____ | 17 |
| Abbildung 3: Schematischer Querschnitt durch ein Klappensegel einer dTEHV. _____ | 19 |
| Abbildung 4: Insert, schematische Darstellung des eingefügten Inserts im Bioreaktor und fertige dTEHV. _____ | 24 |
| Abbildung 5: Katheterablagensystem, zur Implantation der dTEHV. _____ | 26 |
| Abbildung 6: Schema über den Versuchsablauf. _____ | 28 |
| Abbildung 7: Übersicht über die Implantationen der weiterentwickelten dTEHV. _____ | 39 |
| Abbildung 8: Darstellung der Stentablage mittels Durchleuchtung. _____ | 41 |
| Abbildung 9: Insuffizienzgrade der dTEHV direkt nach Implantation. _____ | 42 |
| Abbildung 10: Messposition des Umfangs und der Fläche, bzw. des Stentdurchmessers in mittiger Stentposition. _____ | 43 |
| Abbildung 11: Gemittelter diastolischer Durchmesser der Pulmonalklappe. _____ | 44 |
| Abbildung 12: Box-Whisker-Plot über den Verlauf der Druckdifferenz zwischen rechtem Ventrikel und Pulmonalklappe während der Systole. _____ | 47 |
| Abbildung 13: Profil des quantifizierten Flusses durch die Pulmonalklappe im MRT. _____ | 48 |
| Abbildung 14: Transversalschnitt des Stents auf Höhe der dTEHV aufgenommen im MRT während der Diastole. _____ | 49 |
| Abbildung 15: Verlauf der Regurgitationsfraktion über die Messzeitpunkte des Follow-Up. _____ | 50 |
| Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Körpergewicht und dem enddiastolischen Volumen (EDV) bzw. der Ejektionsfraktion (EF) des rechten Ventrikels der Schafe. _____ | 52 |
| Abbildung 17: PISA-Messung bei Schaf 75 (dTEHV E.2) Woche 12. _____ | 54 |
| Abbildung 18: VC-Messung bei Schaf 62 (dTEHV E.3), Woche 12. _____ | 55 |
| Abbildung 19: Verlauf von PISA, ERO und VC über den gesamten Follow-up-Zeitraum dargestellt durch Median und Interquartilsabstände. _____ | 56 |
| Abbildung 20: Koaptation der Klappensegel der dTEHV. _____ | 59 |
| Abbildung 21: Makroskopische Befunde der Explantation. _____ | 61 |
| Abbildung 22: dTEHV B.2 (Schaf 58) vor Implantation und nach Explantation. _____ | 62 |
| Abbildung 23: Makroskopie der Klappentaschen. _____ | 65 |
| Abbildung 24: Anti-vWF-Färbungen der explantierten dTEHV. _____ | 67 |
| Abbildung 25: Movat-Pentachrom Färbung der dTEHV D.2 (Schaf 64) _____ | 68 |
| Abbildung 26: Septische Absiedelung auf dem Explantat der dTEHV E.1. _____ | 69 |
| Abbildung 27: Von Kossa-Färbung einer explantierten dTEHV. _____ | 70 |
| Abbildung 28: Makroskopischer Vergleich der verschiedenen dTEHV vor Implantation. _____ | 90 |
| Abbildung 29: CFD-Simulationen unserer Konsortialpartner der technischen Universität Eindhoven. _____ | 91 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabelle 1: | Verwendete Inserts und Konfigurationen des Bioreaktors während der Klappenproduktion. _____ | 25 |
| Tabelle 2: | Kriterien zur Bewertung pulmonalarterieller Klappeninsuffizienzen nach ESC-Kriterien [60]. _____ | 33 |
| Tabelle 3: | Antikörper zur Herstellung immunhistochemischer Färbungen und deren Zielstrukturen. _____ | 37 |
| Tabelle 4: | Ergebnisse des maximalen antegraden Flusses durch die Pulmonalarterie (Vmax). _____ | 42 |
| Tabelle 5: | Übersicht über die im CT gemessenen Größenverhältnisse vor Implantation, nach Implantation und vor Explantation. _____ | 45 |
| Tabelle 6: | Druckmessungen der dTEHV im Herzkatheter direkt vor und direkt nach Implantation, sowie direkt vor Explantation. _____ | 46 |
| Tabelle 7: | Messwerte der Regurgitationsfraktion (RF) über der Pulmonalklappe. _____ | 49 |
| Tabelle 8: | Mittelabweichungen der einzelnen dTEHV. _____ | 51 |
| Tabelle 9: | Pearson Korrelation zwischen Körpergewicht, Regurgitationsfraktion, RV-EDV und RV-EF. _____ | 53 |
| Tabelle 10: | Messwerte des PISA-Radius, der ERO und VC. _____ | 56 |
| Tabelle 11: | Maximale Flussgeschwindigkeiten des antegraden Flusses (PvVmax) durch die Pulmonalklappe während der Systole. _____ | 57 |
| Tabelle 12: | Pulmonaler Insuffizienzgrad via ICE im Verlauf des gesamten Follow-ups. _____ | 58 |
| Tabelle 13: | Übersicht über die Koaptationslängen der Klappensegel. _____ | 59 |
| Tabelle 14: | Übersicht über die Explantationszeitpunkte und –gründe. _____ | 60 |
| Tabelle 15: | Tiefe der Hinge Region der drei Klappensegel in der explantierten dTEHV. _____ | 63 |
| Tabelle 16: | Übersicht über die makroskopischen Explantationsergebnisse. _____ | 64 |
| Tabelle 17: | Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse. _____ | 71 |
| Tabelle 18: | Vergleich zwischen dTEHV 1 und dTEHV 2. _____ | 88 |

Zusammenfassung der Arbeit

Einleitung: Viele angeborene Herzfehler und degenerative Herzklappenerkrankungen erfordern einen Herzklappenersatz bei jungen Erwachsenen und Kindern. Degeneration kathetergesteuert implantierter Xenografts limitiert deren Haltbarkeit. Tissue Engineering könnte diese Limitation überwinden indem es Herzklappen die Fähigkeit zur Regeneration gibt. In einem europäischen Konsortium wurde eine dezellularisierte, tissue engineerte Herzklappe (dTEHV) entwickelt. Ein erster Prototyp zeigte aufgrund eines suboptimalen Klappendesigns progrediente Regurgitationen nach 6 Monaten. Mithilfe von computational fluid dynamics (CFD)-Simulationen wurde eine neue Klappen geometrie für eine zweite Generation von dTEHV entworfen.

Methoden: dTEHV basierend auf Gefäßzellen, einem Polymerscaffold und einem Nitinolstent wurden transvenös in 18 Schafe implantiert. Mittels MRT, CT und intrakardialen Ultraschall (ICE) wurde die Klappenfunktionalität für ein Jahr beurteilt, als vorzeitiger Studienendpunkt wurde eine Regurgitationsfraktion (RF) $> 30\%$ im MRT festgelegt. Die explantierten dTEHV wurden histologisch auf Zellen und Gewebezusammensetzung untersucht.

Ergebnisse: Nach den ersten Implantationen wurde das Herstellungsprotokoll der Klappen angepasst und ein stabiles Design der dTEHV entwickelt. Hiervon wurden zehn Klappen implantiert. Neun von zehn Klappen erreichten die vorgegebene Follow-up-Zeit von einem Jahr, ein Tier musste bei einer RF $> 30\%$ vorzeitig euthanasiert werden. Druckmessungen zeigten keine erhöhten Druckdifferenzen zwischen rechtem Ventrikel und Pulomalarterie, was für eine gute Öffnungsfunktion spricht. Im ICE wurden keine erhöhten Druckgradienten während des gesamten Follow-ups festgestellt. Nach Implantation zeigten acht Tiere keine und zwei eine milde Insuffizienz im ICE. Die Klappenfunktionalität war insgesamt gut, die mediane RF im MRT betrug 9 % nach Implantation und 14,2 % nach 52 Wochen. Bei Explantation zeigte ein Tier keine, sechs Tiere eine milde und zwei Tiere eine moderate Insuffizienz im ICE, keine schweren Insuffizienzen wurden festgestellt. Histologisch konnte ein komplettes Anwachsen der implantierten dTEHV und eine vollständige Re-Endothelialisierung gesichert werden, minimale Scaffoldreste waren teilweise noch erkennbar. Die Klappensegel bestanden aus Kollagenfasern, Elastin konnte nicht nachgewiesen werden. Alle explantierten dTEHV wiesen ein adaptives Remodeling auf, eine Fusion zwischen Klappensegel und Transplantatwand bestand nicht.

Schlussfolgerung: Die mithilfe von CFD-Simulationen verbesserte Geometrie führte zu sehr guter Klappenfunktionalität der implantierten dTEHV über ein Jahr. Mechanismen, die zum funktionellen Versagen der ersten Generation von dTEHV führten, konnten weitestgehend überwunden werden. In-vivo Funktionalität sollte jedoch über einen noch längeren Zeitraum erprobt und nachgewiesen werden.

Abstract

Introduction: Many congenital heart defects and degenerative valve diseases require replacement of heart valves in children and young adults. Transcatheter xenografts degenerate over time. Tissue engineering might overcome this limitation by providing heart valves with the ability for self-repair. In a European consortium, a transcatheter decellularized tissue engineered heart valve (dTEHV) was developed. A first prototype showed progressive regurgitation after 6 months due to a suboptimal design. A new geometry was developed using computational fluid dynamics (CFD) simulations leading to a second generation of dTEHV.

Methodology: dTEHV based on vascular derived cells on a polymeric scaffold and a nitinol stent were transvenously implanted in 18 sheep. Valve functionality was assessed via MRI, CT and intracardiac echocardiography for one year. Regurgitation fraction > 30 % in MRI was set to be the premature study endpoint. Histology was performed on the explanted valves to assess cells and tissue composition.

Results: After the first implantations, the manufacturing protocol for valve production was adapted leading to a stable design of dTEHV of which ten valves were implanted. nine out of ten animals then reached the set follow-up time of 52 weeks, one animal had to be euthanized after 24 weeks due to regurgitation fraction exceeding 30% via MRI measurements. Pressure measurements showed no elevated pressure differences between right ventricle and pulmonary artery indicating good opening function. No elevated pressure gradients were detected by ICE throughout the complete follow-up. After implantation eight animals showed no and only two animals mild insufficiency in ICE. Valve functionality was generally good during follow-up. Median regurgitation fraction by MRI was 9 % after implantation and 14,2 % after 52 weeks. At explantation, one animal showed no, six mild and only two animals moderate insufficiency in ICE. No severe insufficiencies were detected. Histological analyses showed complete engraftment of the dTEHV, endothelialization of leaflets and graft wall, very few scaffold remnants were visible. Leaflets consisted mainly of collagenous tissue, no elastic fibers were found. Adaptive leaflet remodeling was visible in all animals. No fusion between leaflet and graft wall was found.

Conclusion: The improved design geometry developed using CFD-simulations resulted in very good valve functionality of the implanted dTEHV over a period of 52 weeks. Failing mechanisms of the first generation of dTEHV were largely overcome. However, sufficient in-vivo functionality needs to be proven over an even longer period of time.

1 Einleitung

Herzklappen sind ein essentieller Bestandteil des menschlichen Herz-Kreislauf-Systems. Sie fungieren als Ein-Weg-Ventile um den Blutstrom in eine Richtung zu leiten. Für die Aufrechterhaltung physiologischer Drücke und der Versorgung des peripheren Gewebes mit Blut sind sie somit unentbehrlich [1].

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Arten der Herzklappen: Taschen- und Segelklappen. Zwischen Vorhöfen und Herzkammern befinden sich die Segelklappen, welche über fadenartige Bindegewebsstränge an Papillarmuskeln und somit dem Myokard des Ventrikels befestigt sind. Während der Systole schließen sich diese Klappen und blähen sich wie ein Segel auf um einen Rückstrom des Blutes in die Vorhöfe zu verhindern. Zu den Segelklappen zählen die Trikuspidal- und die Mitralklappe. Die Taschenklappen sind zwischen Ventrikel und Pulmonalarterie bzw. Aorta ascendens geschaltet und verhindern während der Diastole den Rückstrom des Blutes in den Ventrikel. Ihr Name leitet sich von ihrer anatomischen Form ab, da sie aus drei Taschen zusammengesetzt sind [2].

Im Falle einer erworbenen oder angeborenen Erkrankung dieser Herzklappen kann es erforderlich sein, eine Klappe zu ersetzen [3]. Die heutzutage eingesetzten Herzklappenprothesen bergen jedoch einige Limitationen, sodass die Notwendigkeit besteht alternative Methoden zu erforschen und deren klinische Anwendung zu entwickeln [4].

Das relativ neue Konzept des Tissue-Engineerings bietet die Möglichkeit Herzklappen zu entwickeln, die das Potenzial besitzen könnten, sich zu regenerieren und mit dem Patienten zusammen zu wachsen. Nachdem einige in-vitro Studien vielversprechende Ergebnisse bezüglich der biologischen Eigenschaften solcher tissue-engineerten Herzklappen lieferten [5], muss die präklinische Testung in-vivo erfolgen. Diese Arbeit soll sich der Erprobung solcher tissue-engineerten Herzklappen im Großtiermodell widmen und somit einen Schritt zur klinischen Applikation an Patienten machen.

1.1 Pulmonalklappe: Anatomie und Physiologie

Die Pulmonalklappe (Valva trunci pulmonalis) verbindet den Conus arteriosus (Infundibulum) des rechtsventrikulären Ausflusstrakts im Herzen mit dem Stamm der Pulmonalarterie. Sie verhindert, dass Blut während der Diastole zurück in den rechten Ventrikel strömt. Drei in etwa gleich große,

halbmondförmige Taschen¹ oder Segel formen die Klappe. Sie besteht aus Bindegewebe mit einem Überzug aus Endokard.

Ein Klappenring, der Anulus, umschließt die Pulmonalklappe ringsum. Dieser markiert den Übergang zwischen dem ventrikulären Infundibulum und der fibroelastischen Wand der Pulmonalarterie. Die einzelnen Taschen oder Klappensegel können in verschiedene Bereiche eingeteilt werden: Die Gelenkzone (Hinge-Region), welche die Verbindung zwischen Segel und Klappenwand bezeichnet, der Bauch als der größte Anteil des Segels und am oberen Segelrand die Lunula valvulae semilunaris, eine leichte Ausdünnung des Segels als Randsaum. In der Mitte jedes Klappensegels bilden die einzelnen Lunulae ein feines Knötchen, der Nodus valvulae semilunaris. Bei einem suffizienten Klappenschluss lagern sie die Lunulae valvulae semilunaris aneinander und bilden eine Koaptationszone [2, 6]. Die drei Taschen der Pulmonalklappe werden gemäß ihrer anatomischen Lage Valvula semilunaris anterior, sinistra und dextra genannt.

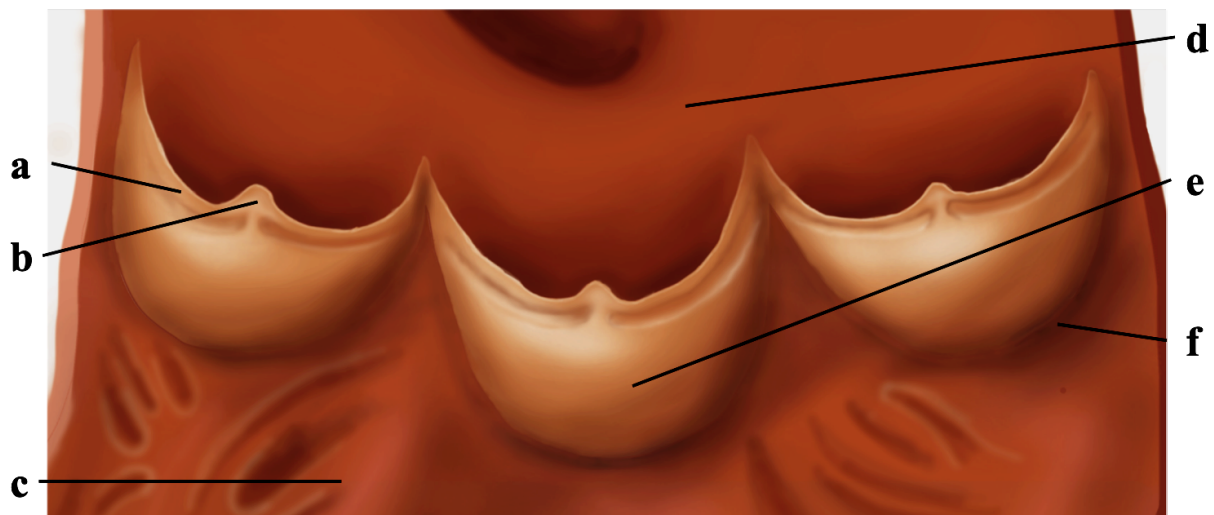


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Pulmonalklappe.

Modifiziert nach Schünke et al. 2016 [2]. a = Lunula; b = Nodus; c = RVOT; d = Pulmonalarterie; e = Klappentasche; f = Hinge region.

Alle Herzklappen besitzen histologisch einen grundsätzlich ähnlichen Aufbau. Sie stellen Duplikaturen des Endokards dar, bestehen daher überwiegend aus kollagenem Bindegewebe mit elastischen Anteilen und sind vollständig mit Endothel überzogen. Zur Herzinnenseite hin findet sich eine Lage einschichtiges Endothel, auf der arteriellen Seite überlappen sich die Lagen des Endothels teilweise [6, 7].

¹ Daher leitet sich der Name „Semilunarklappe“ oder „Taschenklappe“ ab.

Es können fünf Schichten von der ventrikulären bis zur arteriellen Seite im Aufbau lichtmikroskopisch voneinander unterschieden werden: Die Lamina ventricularis liegt direkt unterhalb einer ventrikelseitigen Endothelschicht und besteht aus überwiegend retikulärem Bindegewebe mit geringen Kollagen- und Elastinanteilen. In der darüber liegenden Lamina radialis finden sich speichenartig angeordnete kollagene und elastische Fasern. Die Lamina spongiosa besteht aus lose angeordneten retikulären Fasern mit einem hohen Gehalt an Hyaluronan und Proteoglykanen. Kollagenbündel und einige elastischen Fasern sind ebenso wie Fibroblasten und Makrophagen zu finden. Die Lamina fibrosa wird von zirkulär angeordneten Kollagenfasern gebildet². Die Bindegewebsschicht auf der arteriellen Seite der Klappentaschen ist die Lamina arterialis, welche sich überwiegend aus lockerem retikulärem Bindegewebe zusammensetzt [1, 6, 7].

1.2 Angeborene Herzklappendefekte

Je nach Studie kommen etwa zwischen 4 und 14 von 1000 Kindern mit einem angeborenen Herzfehler auf die Welt [8]. Nachdem seit 1930 steigende Prävalenzen zu beobachten waren, ist die aktuelle Prävalenz bei etwa 9 angeborene Herzfehler pro 1000 Geburten seit 1995 stabil [9]. Weltweit haben demnach ca. 1,35 Millionen Menschen einen angeborenen Herzfehler [10] was etwa ein Drittel aller kongenitalen Fehlbildungen ausmacht [11].

Die Pulmonalklappe ist die am häufigsten von einem angeborenen Herzfehler betroffene Klappe [12]. Wird diese Klappe insuffizient, so hat dies im langfristigen Verlauf einen gravierenden dilatierenden Effekt auf den rechten Ventrikel. Ebenso wird durch eine Obstruktion des RVOT die rechte Herzkammer einer erhöhten Druckbelastung ausgesetzt [3]. Durch Insuffizienz und Stenose wird im chronischen Verlauf die Entstehung einer Dilatation und Fibrosierung des Ventrikels die Anfälligkeit gegenüber Arrhythmien und dadurch einer rechtsventrikulären Dysfunktion oder dem plötzlichen Herztod gesteigert [13, 14]. Vor allem Patienten mit einer moderaten bis schweren pulmonalen Regurgitation, sowie Patienten, die erst spät eine operative Korrektur eines angeborenen Herzfehlers, wie etwa einer Fallot'schen Tetralogie, erhielten, sind dem Risiko von Arrhythmien ausgesetzt. [14, 15].

² Bei allen Herzklappen liegt die Lamina fibrosa stets auf der Seite, welche bei geschlossener Klappe aufgrund des mechanischen Drucks beansprucht wird. Bei den Valvulae semilunaris ist sie dementsprechend der arteriellen Seite zugewandt.

Aufgrund der häufigen Beteiligung an angeborenen Herzfehlern und der Tragweite ihrer Dysfunktion ist die Pulmonalklappe die am häufigsten ersetzte Herzklappe bei angeborenen Klappendefekten [16].

1.3 Aktuell eingesetzte Klappenprothesen

Derzeitig werden weltweit pro Jahr etwa 300 000 Herzklappen ersetzt [17, 18]. Für einen solchen Klappenersatz stehen grundsätzlich zwei verschiedene Arten von Herzklappenprothesen zur Verfügung: mechanische und biologische Klappen. Die mechanischen Klappenprothesen machen mit 55% gegenüber den biologischen mit 45% den etwas größeren Anteil der eingesetzten Klappen aus [19]. Diese Arten der Klappenprothesen bringen jedoch einige Limitationen mit sich.

Mechanische, also aus Metall und Polymer gefertigte Klappen besitzen zwar eine lange Haltbarkeit, jedoch ist eine lebenslange hohe antikoagulatorische Therapie erforderlich um thrombotische Auflagerungen an der Prothese zu verhindern. Nach dem Einsatz einer solchen Klappe ist folglich mit Blutungskomplikationen unter Antikoagulation bzw. thrombembolischen Ereignissen zu rechnen [20].

Biologische Klappen werden meist aus porcinen³ Herklappen, bzw. aus bovinem⁴ Perikard gefertigt [21]. Diese Arten der Herzklappenprothesen werden als Xenografts⁵ bezeichnet. Im Gegensatz zu mechanischen Herzklappen ist eine antikoagulatorische Therapie nur postoperativ und in Ausnahmefällen längerfristig nötig [21, 22]. Die Hauptproblematik der biologischen Herzklappen besteht darin, dass sie im Laufe der Zeit degenerieren und somit eine begrenzte Haltbarkeit aufweisen [23] [24]. Hierbei spielt vor allem die Kalzifizierung der Klappensegel eine entscheidende Rolle [25]. Diese Kalzifizierung wird vermutlich durch die Glutaraldehyd-Fixierung des Klappengewebes vor Implantation, welche eine Rebesiedelung mit körpereigenen Zellen erschwert, und einer folgenden Immunreaktion gegen dieses quervernetzte Gewebe begünstigt und vorangetrieben [26] [27]. Aufgrund dieser Degeneration ist die Indikationsstellung zur Implantation biologischer Klappenprothesen neben anderen Faktoren vor allem für Patienten zwischen 50 und 70 Jahren empfohlen [23, 28].

Eine weitere Limitation sowohl biologischer, als auch mechanischer Herzklappenprothesen ist ihre fehlende Fähigkeit zur Regeneration und zu Wachstum. Dies wird vor allem bei pädiatrischen und

³ Vom Schwein stammend

⁴ Vom Rind stammend.

⁵ Von einer fremden Spezies stammend. Griechisch xénos=Fremder.

adoleszenten Patienten relevant. Bei Patienten, die einen Pulmonalklappenersatz im Rahmen der Korrektur einer Fallot'schen Tetralogie bekamen, mussten 79% der Reoperationen aufgrund einer Insuffizienz der eingesetzten Klappe während einer Nachbeobachtungszeit vom acht Jahren durchgeführt werden. 21% der neu eingesetzten Klappen mussten aufgrund einer Stenose in diesem Zeitraum ausgetauscht werden. Hauptgrund für die Entstehung von Klappenfehlfunktionen war vor allem das Wachstum der Patienten [29].

Allografts oder Homografts⁶ weisen zwar sehr gute hämodynamische Funktionalität auf, jedoch ist auch hier die Verkalkung eine zentrale Limitation, welche die Entwicklung alternativer Klappenprothesen notwendig macht. Die Verfügbarkeit solcher Allografts ist von der Spenderbereitschaft abhängig und aufgrund eines Mangels an Organspenden begrenzt [30].

1.4 Minimalinvasiver Klappenersatz

Bevor minimalinvasive perkutane Techniken für den Ersatz einer Herzklappe entwickelt wurden, war die einzige Möglichkeit der Behandlung einer schwerwiegenden Klappendysfunktion der kardiochirurgische Eingriff [31].

Im Jahr 2000 veröffentlichten Philipp Bonhoeffer et al. im Lancet eine Fallstudie über die erste erfolgreiche perkutane Implantation einer Pulmonalklappe beim Menschen [32]. Dieser minimalinvasive Klappenersatz wurde im Verlauf bei mehreren Patienten durchgeführt und lieferte vielversprechende Ergebnisse um eine zuverlässige Alternative zum chirurgischen Klappenersatz zu bieten [33]. Vezmar et al. konnten 2010 nachweisen, dass 36 Monate nach einem perkutanen Klappenersatz bei adoleszenten Patienten mit angeborenem Herzfehler 80% der Patienten immer noch reinterventionsfrei waren. Eine Verbesserung der subjektiven Symptome, der Hämodynamik und objektiver Leistungsparameter war hierbei zu beobachten [34].

Der Stand der Technik und Wissenschaft legen dementsprechend nahe, dass kathetergesteuerte Klappenimplantationen eine effiziente und sichere Alternative zum regulären, chirurgischen Klappenersatz sind. Seitdem hat sich das minimalinvasive Verfahren zu einer adäquaten Behandlungsalternative bei hämodynamisch relevanten Klappendefekten entwickelt, insofern die Anatomie des RVOT passend erscheint. Durch die Weiterentwicklung von Katheterablagesystemen, Stents und den Herzklappen selbst sowie strukturierter Langzeitstudien, konnte die Indikationsstellung zum minimalinvasiven Klappenersatz erweitert werden [3].

⁶ Beide entsprechen einem Transplantat welches von einem Spender der gleichen Spezies stammt.

Die minimalinvasiven Techniken konnten vor allem die Anzahl der Operationen am offenen Herzen senken, denen sich Patienten mit angeborenen Herzfehlern unterziehen müssen und senkt somit die Morbidität dieser Patienten [35]. Vor allem bei Patienten über 75 Jahre mit hohem perioperativem Operationsrisiko wird derzeit ein minimalinvasiver Klappenersatz empfohlen [36]. Obwohl es enorme Fortschritte in der Weiterentwicklung des minimalinvasiven Klappenersatzes in den letzten Jahren gegeben hat, stehen belastbare Langzeitergebnisse über einen Follow-Up Zeitraum von mehr als 20 Jahren noch aus [37].

1.5 Tissue Engineering

Das Konzept des Tissue Engineering beschreibt ein interdisziplinäres Feld, in welchem die Grundlagen der Ingenieurs- und biomedizinischen Wissenschaften angewandt werden um biologisches Gewebe zu entwickeln und die Funktion körpereigenen Gewebes aufrecht zu erhalten, zu verbessern oder gar wiederherzustellen [38]. Die Grundlegende Idee des Tissue Engineerings reifte in den frühen 1970er Jahren, als Dr. W.T. Green aus durchgeführten Experimenten schloss, es müsse möglich sein Gewebe zu generieren, indem man lebens- und entwicklungsfähige Zellen auf eine angemessene Trägermatrix – einen Scaffold – aufbringt. In den darauffolgenden Jahren wurden ähnliche Konzepte erprobt, so etwa die Züchtung von tissue engineerter Hauttransplantaten und das Aufbringen von Keratinozyten auf verbrannte Hautareale. Hierbei wurden stets natürliche Matrizen als Scaffold verwendet. Mitte der 1980er Jahre hatten Dr. J. Vacanti und Dr. Robert Langer die Idee, passende Scaffolds selbst zu designen um nicht abhängig von natürlich vorkommenden Strukturen zu sein. Biokompatible und bioresorbierbare Polymere wurden in der Folge zu einem Scaffold geformt und dienten als Trägermatrix für das Säen der entsprechenden Zellen [39]. Die Möglichkeit Scaffolds selbst herzustellen, beispielsweise computergesteuert, resultiert in einer deutlich höheren Reproduzierbarkeit der Architektur und Zusammensetzung des gesamten Scaffolds [40]. In ihrem 1993 im *Science* veröffentlichten Paper „*Tissue Engineering*“ sahen Langer und Vacanti schon das enorme Potenzial, welches dieses neue Verfahren birgt. Sie schlossen, dass „wenige Bereiche der Technologie (...) das Potenzial besitzen die Lebensqualität mehr zum Positiven zu beeinflussen“ [38]. Seitdem wurde die Möglichkeit des Tissue Engineerings an fast jedem Gewebe des menschlichen Körpers erprobt [41].

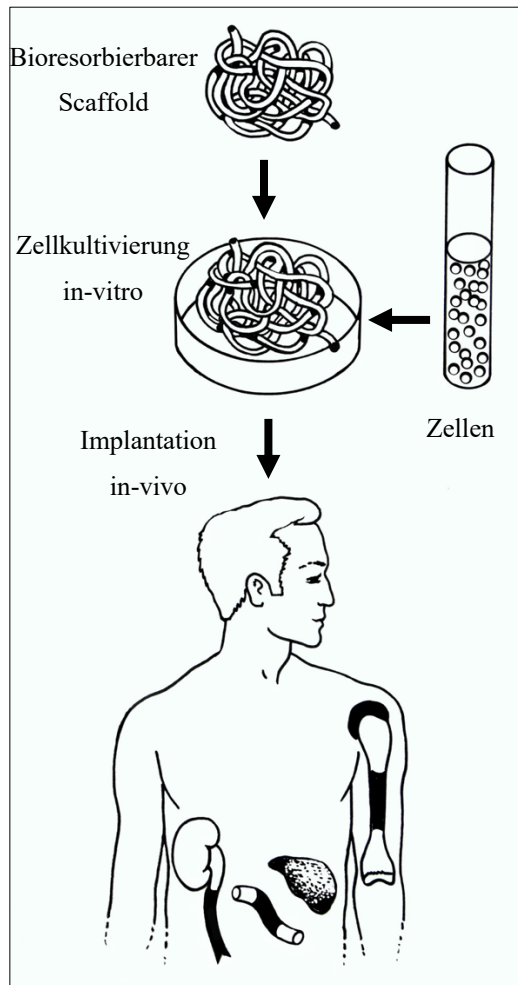


Abbildung 2: Grundlegende Mechanismen des Tissue Engineerings.

Zellen unterschiedlicher Gewebearten werden auf einen bioresorbierbaren Scaffold aufgeimpft und dann in-vivo implantiert. Modifiziert nach Langer, R. and J. Vacanti, Tissue engineering. Science, 1993 [38]

1.5.1 Tissue engierte Herzklappen

Auch in der Entwicklung neuer Herklappenprothesen kommt das Konzept des Tissue Engineerings zum Tragen. Tissue engierte Herzklappen (TEHV) könnten die bekannten Limitationen mechanischer und biologischer Herzkappen verbessern oder gegebenenfalls sogar überwinden [42]. Herzklappen, also spezialisiertem Endokard, kommt die Bedeutung zu einen unidirektionalen Blutfluss zu gewährleisten. Physiologischerweise kommt es während der Öffnung der Klappensegel zu keiner Obstruktion sowie zu einem suffizienten Klappenschluss ohne die Entstehung einer Regurgitation. Die Funktion der Klappe hängt daher unabdingbar von der Mobilität, Flexibilität sowie makro- und mikrostrukturellen Integrität der Klappensegel zusammen [4].

Native Herzklappen passen sich im Laufe des Lebens in einem fortwährendem Remodelingprozess an auftretende Veränderungen wie beispielsweise des Blutdrucks oder der anatomischen Verhältnisse an und halten eine Homöostase aufrecht [43]. Hierzu essenziell sind Endothelzellen auf der Herzklappe, von deren Funktion die Haltbarkeit und Entwicklungsfähigkeit der Klappe abhängig ist [44]. Das Ziel beim Entwickeln einer Tissue engineerten Herzklappe ist es, diese Endothelzellen angemessen zu stimulieren, um einen Remodelingprozess der extrazellulären Matrix zu initiieren und lebensfähiges Gewebe zu erschaffen, welches potenziell mitwachsen kann [4].

Es gibt verschiedene Herangehensweisen zum Herzklappen-Tissue Engineering. Was den Scaffold betrifft, so lassen sich zwei verschiedene Arten unterscheiden: Biologische und synthetische Trägermatrizen. Biologische Trägermatrizen sind generell gesagt die extrazelluläre Matrix xeno- oder homogener Herzklappen. Solche biologischen Scaffolds können mit Glutaraldehyd quervernetzt werden, sind dann jedoch schwer mit Endothelzellen zu rebesiedeln. Alternative Methoden zur Gewebefixierung bergen hingegen eine Unsicherheit bezüglich der immunologischen Reaktionen, da weiterhin antigene Strukturen auf der Klappe präsentiert werden können. Synthetische, bioresorbierbare Polymer-Scaffolds scheinen sicher in der Applikation zu sein. Zusätzlich können Zellen diese Strukturen einfach rebesiedeln [42] (Abbildung 3).

Ein erstes Konzept des Tissue Engineerings wurde von Shinoka et al. im Jahre 1995 mit einem Scaffold aus Polyglykolsäure angewandt [45]. Auf dieser Basis gezüchtete Herzklappen wurden im Verlauf in juvenile Schafe implantiert. Hierbei verschlechterte sich die Klappenfunktion jedoch mit der Zeit. Vor allem jedoch wurde der Scaffold nicht resorbiert und durch autologes Gewebe ausgetauscht [42].

Neben dem Scaffold spielen Art und Kultivierung der Zellen im Tissue Engineering von Herzklappen eine große Rolle. Meist werden Zellen aus Arterien- oder Venenbiopsien verwendet, jedoch kann diese Methode für Patientengruppen mit Arteriosklerose ungeeignet sein. Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark oder Progenitorzellen aus dem peripheren Blut könnten hierbei vielversprechende Alternativen bieten, da sie einfach zu erhalten sind, sich schnell vermehren und vor allem in verschiedene Gewebearten differenzieren können [42].

Auf Basis eines bioresorbierbaren Scaffolds entwickelten Hoerstrup et al. sowohl mit ovinen Myofibroblasten und Endothelzellen [46] als auch mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmarkspunktionen [47] eine tissue engineerte Herzklappe. Die Umsetzbarkeit des Konzeptes des Tissue Engineering im Bereich der Entwicklung neuer Herzklappen war somit belegt. Mol et al. entwickelten in einem ähnlichen Versuchsaufbau, jedoch mit humanen

Myofibroblasten aus einem chirurgisch extrahierten Präparat der Vena saphena magna eines 77-jährigen Mannes, eine tissue engineerierte Herzklappe. Die Ergebnisse der in-vitro Testung der hierbei entwickelten Klappen legten nahe, dass auch eine in-vivo Testung vielversprechend sei [48].

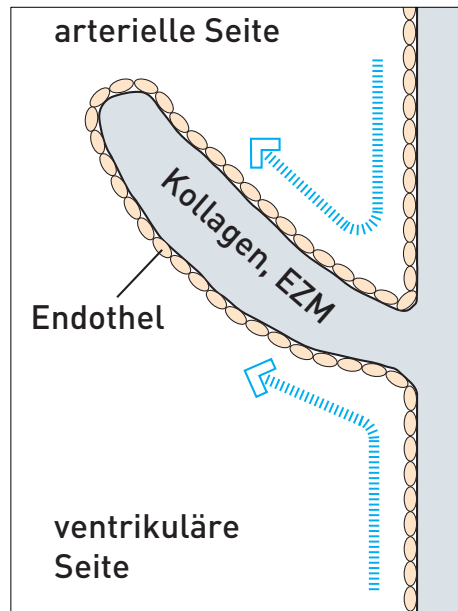


Abbildung 3: Schematischer Querschnitt durch ein Klappensegel einer dTEHV.

Die Struktur des Segels wird größtenteils von Kollagen und anderer extrazellulärer Matrix (EZM) bestimmt. Nach der Implantation fangen körpereigene Endothelzellen an, die Klappe zu rebesiedeln und bilden eine neue Endothelschicht bzw. eine Neointimie. Die blauen Pfeile geben die Richtung der Endothelialisierung an.

1.6 Schaf als Modell

In der Erforschung von Herzklappen im präklinischen Kontext hat sich das Schaf als ein verlässliches Modell etabliert. Sowohl Anatomie als auch Physiologie des ovinen Herz-Kreislaufsystems sind durchaus vergleichbar mit dem des Menschen. Zusätzlich sind Schafe relativ einfach in der Handhabung und ihre Verfügbarkeit ist sehr gut [49, 50].

Überdies hat sich das Schaf vor allem zur Untersuchung von Kalzifikationen an Herzklappen als geeignetes Modell etabliert, da klinisch relevante morphologische und pathobiologische Vorgänge gut simuliert werden können [51].

1.7 LifeValve

Das Projekt LifeValve war ein seit 2009 im Rahmen des 7th Framework Programme der Europäischen Union gefördertes interdisziplinär arbeitendes Konsortium mit Partnern in den Niederlanden, Österreich, der Schweiz, Ungarn und Deutschland. Ziel des Konsortiums war es, eine Herzklappe zu entwickeln, welche die Möglichkeit besitzt mitzuwachsen. Aufgrund der Erfahrung der Konsortialpartner im Umgang des Tissue Engineering bei Herzklappen sollte diese vielversprechende Technologie, zusammen mit der Anwendung minimalinvasiver Implantationstechniken weiter entwickelt werden um dieses Ziel zu erreichen.

Die Konsortialpartner der Technischen Universität Eindhoven in den Niederlanden um Anita Mol et al. entwarfen bereits 2005 einen neuartigen Bioreaktor zur Kultivierung tissue engineerter Herzklappen. Eine pulsatile Fluss durch die sich entwickelnde Herzklappe wurde innerhalb eines geschlossenen Systems im Bioreaktor angewandt um eine dynamische Belastung der Klappensegel während der Kultivierung zu induzieren [52].

Dijkman et al. erklärten in einer 2012 veröffentlichten Arbeit, Dezellularisierung tissue-engineerter Herzklappen, sowie deren Rezellularisierung vor Implantation seien mögliche und durchführbare Anwendungsmöglichkeiten. Eine Dezellularisierung veränderte die Kollagen-Struktur der im Bioreaktor kultivierten TEHV nicht und verbesserte sogar deren Funktion gegenüber nicht-dezellularisierten TEHV. Auch die Lagerung über 18 Monate hinweg veränderte die mechanischen Eigenschaften der Klappen nicht signifikant. Damit wurden solche dezellularisierten tissue engineerter Herzklappen (dTEHV) als mögliche Alternative zu herkömmlichen Xen- oder Homografts dargestellt [5].

Driessen-Mol et al zeigten 2014 einen Ansatz der transapikalen minimalinvasiven Implantation solcher dTEHV im Großtiermodell. Hierbei wurden die implantierten Klappen 24 Wochen im Tier belassen, anschließend explantiert und histologisch untersucht. Die histologische Analyse ergab eine Re-Endothelialisierung der Klappe, jedoch eine Fusion zwischen Klappensegel und Konduitwand im Bereich der Hinge Region, was zu einer Verkürzung der Segel und somit schweren zentralen Insuffizienzen führte [53].

Die Durchführbarkeit der transvenösen minimalinvasiven Implantation einer vollständig tissue engineerter Herzklappe mit einem selbstexpandierbaren Nitinolstent wurde von Priestersbach et al. im Schafsmodell dokumentiert. Hierbei zeigten die Klappen echokardiographisch flexible und sich gut bewegende Segel, jedoch schon initial moderate bis schwere Insuffizienzen [54].

Schmitt et al. [55] zeigten darüber hinaus, dass in-vivo ein Remodeling-Prozess innerhalb der Klappe in Gang gesetzt wird. Hierfür wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau wie von Priestersbach et al. verwendet, jedoch eine Nachbeobachtungszeit von maximal 24 Wochen angestrebt.

Spätestens 16 Wochen nach Implantation zeigte sich eine durchgängige Endothelschicht auf den Klappentaschen und an der Wand des implantierten Grafts. Der verwendete Scaffold, ein Geflecht aus Polyglykolsäure, wurde sukzessive durch extrazelluläre Matrix ausgetauscht, jedoch waren selbst nach 24 Wochen noch Reste des Scaffolds in den Klappentaschen vorhanden.

Ähnlich wie bei Driessen-Mol et al. [53] entwickelten sich fortschreitende Insuffizienzen über den Verlauf der Nachbeobachtungszeit. Diese beruhten vor allem auf einer Verkürzung der Klappentaschen. Hierfür wurden zwei Hauptgründe ausgemacht: die Fusion zwischen Klappentasche und der Graftwand sowie eine aktive Verkürzung des Segels aufgrund von α -SMA positiven Zellen auf der Klappe. Es wurde der Schluss gezogen, dass aufgrund einer suboptimalen Geometrie der Klappe selbst die physikalische Beanspruchung der Klappentaschen während der Diastole nicht physiologisch ist. Eine fehlende Dehnung der Klappentaschen unterstützt die aktive durch α -SMA positive Zellen getriggerte Verkürzung und trägt somit maßgeblich zu den erlangten Ergebnissen bei. Mit der von Schmitt et al. verwendeten Klappengeometrie ließen sich demnach keine positiven Langzeitergebnisse einer TEHV im Tiermodell erzielen [55]. Die Konsortialpartner Sanders et al. entwarfen anschließend anhand von computational fluid dynamic (CFD) gestützten Simulationen eine geometrisch optimierte dTEHV, um dieser Segelretraktion entgegen zu wirken. Sowohl in Computersimulationen, als auch in der in-vitro Testung zeigte diese neue Klappengeometrie der zweiten Generation dTEHV eine adäquate Funktionalität bezüglich ihrer Öffnungs- und Schlussfunktion [56].

1.8 Fragestellung

Es ist medizinisch erstrebenswert eine Herzklappe zu entwickeln, welche die Möglichkeit des Mitwachsens bietet, eine gute Funktionalität bezüglich ihres Öffnungs- und Schlussverhaltens aufweist, keine Antikoagulation benötigt und kein immunogenes Potenzial birgt, einfach und atraumatisch zu implantieren ist und möglichst lebenslang haltbar ist.

Dezellularisierte, tissue engineerete Herzklappen könnten verbunden mit einer transvenösen Implantationsmethode diese Eigenschaften in einem medizinischen Produkt vereinen.

Aufgrund der vorangegangenen tierexperimentellen Versuche bestand die Frage, ob es möglich sei durch die verbesserte Geometrie der dTEHV den Mechanismen, die in der ersten Generation von dTEHV zum funktionellen Versagen führten, vorzubeugen und entgegen zu steuern. Durch eine bauchigere Form der Segel sollte deren mechanische Belastung während der Diastole physiologischer werden und somit der Retraktion und Verkürzung der Klappensegel vorbeugen.

Durch eine größere Koaptationszone am oberen Segelrand sollte das Schlussverhalten der Klappe verbessert werden.

Dem Deutschen Herzzentrum Berlin oblag im Konsortium LifeValve die Planung und Durchführung tierexperimenteller Studien mit den von den Konsortialpartnern produzierten dTE-Herzklappen. Durch eine auf 12 Monate angesetzte prospektive tierexperimentelle Studie sollte validiert werden, ob die neue Generation der dTEHV über diese Zeit hinweg eine gute Funktionalität in-vivo zeigen und den Mechanismen, die zum Klappenversagen in der ersten Generation führten, Einhalt geboten werden konnte. Es sollten Daten über die hämodynamischen Druckverhältnisse an der Klappe, die mechanischen Eigenschaften des Stents, sowie den Erfolg der Implantationsmethode gesammelt werden.

Speziell sollte vor allem durch die Verbindung verschiedener Messmethoden in der Nachbeobachtungszeit der funktionelle Verlauf der dTEHV detailliert mithilfe von CT, MRT und intrakardialen Ultraschall (ICE) dargestellt werden. Darüber hinaus sollten noch histologische Begutachtungen Aufschluss über die zellulären Mechanismen und Abläufe innerhalb der Klappe geben.

Computergestützte Simulationen sagten bereits eine verbesserte Funktionalität der neuen Generation von dTEHV voraus. Es sollte geprüft werden, inwieweit diese Simulationen kongruent mit der zu beobachtenden funktionellen Entwicklung der implantierten Herzklappen sind und nach Gründen und Ursachen für etwaige Abweichungen gesucht werden.

Durch die Erstellung solcher Langzeitergebnisse könnte die Studie als Vorläuferstudie dienen um zukünftig eine solche Art der dTEHV an Menschen testen zu können.

Zusammenfassend ergaben sich also drei maßgebliche Fragenkomplexe für diese Arbeit:

1. Ist die zweite Generation dezellularisierter, tissue engineerter Herzklappen wirklich funktionell stabiler und besser als der bereits getestete erste Prototyp von dTEHV?
2. Wie verhält sich die Langzeitfunktionalität der implantierten dTEHV?
3. Konnte mithilfe von CFD Simulationen eine bessere Geometrie für die dTEHV geschaffen werden?
4. Gibt es einen Anhalt für ein aktives Remodeling bzw. Umbauprozesse innerhalb der Klappe?

Diese Fragen sollen in der nachfolgenden Arbeit beantwortet werden.

2 Methoden

2.1 Klappe & Stent

Zur Implantation wurden dezellularisierte tissue engierte Pulmonalklappen (decellularized tissue engineered heart valves, dTEHV), die in einen selbstexpandierenden Nitinol-Stent eingenäht wurden, verwendet.

Der genaue Ablauf der Produktion der dTEHV wurde bereits an anderer Stelle detailliert beschrieben [52, 56]. Vereinfacht lässt sich das Vorgehen hierbei folgendermaßen darstellen:

Ein Herzklappenscaffold aus Polyglykolsäure (PGA; Stärke 1,0 mm; spezifisches Gewicht 70 mg/cm³; Cellaon, Luxemburg) mit drei Klappensegeln bildete die Trägermatrix, auf die später Zellen aufgetragen werden konnten. Der Scaffold wurde in einen selbstexpandierenden Nitinolstent (Länge = 30 mm, Innendurchmesser bei 37°C = 30 mm, pfm-AG, Köln, Deutschland) mit Einzelknopfnähten (Prolene 6-0, Ethicon, USA) eingenäht. Die einzelnen Klappensegel der Matrix wurden mit einer dünnen Schicht aus Poly-4-Hydroxybutyrat (P4HB, TEPPA Inc., Cambridge, USA) in Tetrahydrofuran (THF, Sigma-Aldrich, USA) überzogen. Diese Trägermatrix wurde anschließend mit 70% Ethanol (EtOH, VWR international S.A.S. Fontenay-Sous-Bois, Frankreich) für 15 Minuten sterilisiert, dreimal in einer Phosphat-Puffer-Lösung (PBS) für 10 Minuten gewaschen und anschließend mit einer 10% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Lonza, Belgien), zusammen mit 0,5% Fungin (InvivoGen, USA) 30 Minuten inkubiert und erneut drei Waschzyklen zu jeweils 10 Minuten mit PBS unterzogen. Im Anschluss wurden der Scaffold über Nacht in einem Nährmedium (Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, USA), ergänzt durch 10% fetales ovines Serum (FBS, Biochrom, Deutschland), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamax (Gibco, USA) inkubiert um die initiale Zellanhaftung zu verbessern. Aus ovinen Gefäßzellen abgeleitete Myofibroblasten wurden aus einem im Vorfeld etablierten [57] Zellpool gewonnen und mit einer Dichte von $0,3 \times 10^6$ Zellen/cm² auf den Scaffold gesät. Fibrin fungierte hierbei als Zellträger. Anschließend wurden die beimpften Klappen in einem Nährmedium (Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, USA) ergänzt durch 0,1%, 0,5% oder 1,0% Lamm-Serum, 1% Glutamax (Gibco, USA) 1% Penicillin/Streptomycin zusammen mit L-Ascorbinsäure 2-Phosphat (0,25 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA), sowie einem formgebenden Plastikeinsatz in einen Bioreaktor eingebracht. Ein pulsatiler Fluss von 4 ml/min mit einer Frequenz von 1 Hz wurde angelegt.

Die verbesserte Geometrie dieser dTEHV im Gegensatz zu einer ersten Generation von dTEHV (vgl. hierzu Abschnitt 1.7) [54, 55] wurde bereits an anderer Stelle genauer beschrieben [56]. Zur optimaleren Formgebung der Klappensegel wurden sogenannte Inserts (Plastikeinsätze)

verwendet um den Klappensegeln während der Inkubationszeit im Bioreaktor eine Struktur vorzugeben.

Die Einsätze wurden aus einem massiven Stück Polyether-Ether-Keton (PEEK) mittels computergesteuerter Frästechnik auf eine Länge von 27,8 mm und einen Durchmesser von 29,7 mm gefertigt [56]. Die Inserts wurden auf der arteriellen Seite der Klappe positioniert und waren mit kleinen Löchern (0,5 mm Durchmesser), sowie großen Öffnungen an der Spitze ausgestattet, um eine gute Zirkulation des Mediums und eine Versorgung des Klappengewebes zu gewährleisten (Abbildung 4).

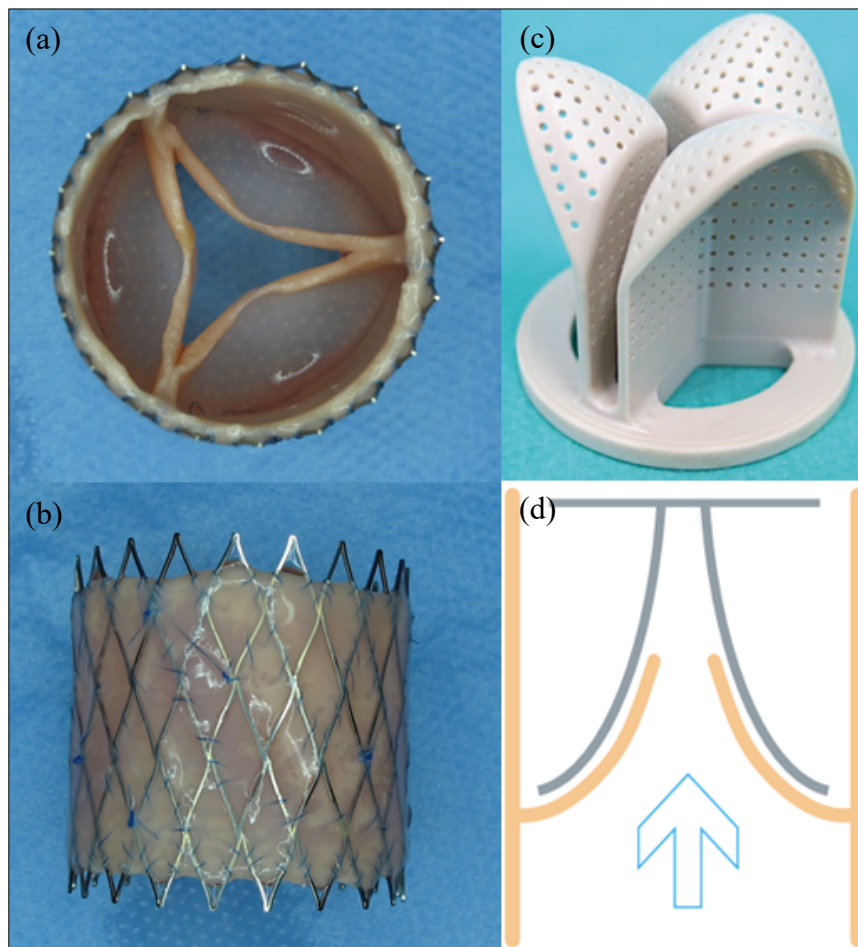


Abbildung 4: Insert, schematische Darstellung des eingefügten Inserts im Bioreaktor und fertige dTEHV.

(a) und (b): Dezellularisierte, tissue engineerte Herklappe in einen Nitinol-Stent eingenäht in der Ansicht von oben in die Klappentaschen hinein (a) und seitlich (b). (c): Formgebender Plastik-Insert des Designs V3. Die Inserts des Designs V4 besaßen ein zusätzliches Loch im Bereich der Koaptationszone um die Zirkulation des Inkubationsmediums zu verbessern (Tabelle 1). (d) Schematische Darstellung des Inserts (grau) auf den Klappensegeln (orange) im Bioreaktor. Der blaue Pfeil gibt die Flussrichtung des Mediums, welche im Bioreaktor angelegt wurde, an.

Für die Klappenproduktion dieser Studie wurden zwei verschiedene Konfigurationen von Inserts verwendet, was eine unterschiedliche Zirkulation an den Klappensegeln zur Folge hatten. Je nach Zeitpunkt der Hinzugabe der Inserts in den Bioreaktor resultierte dies in einer unterschiedlichen Konfiguration des Klappengewebes. Hieraus leiteten sich verschiedene Produktionsreihen der dTEHV ab, die in die jeweils angegebenen Schafe implantiert wurden (Tabelle 1).

| Schaf Nummer | Bezeichnung der dTEHV entsprechend der Produktionsreihe | Insert | Insert hinzugefügt | Serum Konzentration (%) im Inkubationsmedium | Design |
|--------------|---|--------|--------------------|--|----------|
| 51 | A.1 | V3 | von Beginn an | 0,1 | dTEHV1.1 |
| 52 | A.2 | V3 | von Beginn an | 0,1 | dTEHV1.1 |
| 53 | A.3 | V3 | von Beginn an | 0,1 | dTEHV1.1 |
| 54 | A.4 | V3 | von Beginn an | 0,1 | dTEHV1.1 |
| 55 | A.5 | V3 | von Beginn an | 0,1 | dTEHV1.1 |
| 56 | A.6 | V3 | von Beginn an | 0,1 | dTEHV1.1 |
| 72 | A.7 | V4 | von Beginn an | 1,0 | dTEHV1.1 |
| 57 | B.1 | V4 | von Beginn an | 0,1 | dTEHV2.0 |
| 58 | B.2 | V4 | von Beginn an | 0,1 | dTEHV2.0 |
| 61 | C.1 | V4 | von Beginn an | 0,5 | dTEHV2.0 |
| 63 | C.2 | V4 | von Beginn an | 0,5 | dTEHV2.0 |
| 60 | D.1 | V4 | nach 10 Tagen | 0,5 | dTEHV2.0 |
| 64 | D.2 | V4 | nach 10 Tagen | 1,0 | dTEHV2.0 |
| 65 | D.3 | V4 | nach 10 Tagen | 1,0 | dTEHV2.0 |
| 73 | E.1 | V4 | nach 13 Tagen | 1,0 | dTEHV2.0 |
| 75 | E.2 | V4 | nach 13 Tagen | 1,0 | dTEHV2.0 |
| 62 | E.3 | V4 | nach 13 Tagen | 1,0 | dTEHV2.0 |
| 100 | E.4 | V4 | nach 13 Tagen | 1,0 | dTEHV2.0 |

Tabelle 1: Verwendete Inserts und Konfigurationen des Bioreaktors während der Klappenproduktion.

Nach vier Wochen wurden die TEHV aus dem Bioreaktor entfernt. Eine Dezellarisierung erfolgte, indem die Klappen drei Waschzyklen zu jeweils 10 Minuten mit PBS durchliefen und über Nacht in einer Reinigungslösung (0,25% Triton X-100, Natrium Desoxychlorat und 0,02% EDTA) gelagert wurden. Danach wurde auch der Insert entfernt. Kernfragmente wurden mittels Benzonase (EMD Millipore, USA), verdünnt in einer 50 mM TRIS-HCl Pufferlösung mit Konzentrationen von 100, 80 und 20 U/mL für 8, 16 und 8 Stunden auf einem Schüttelapparat bei 37°C enzymatisch abgebaut. Im Anschluss folgten weitere drei Waschzyklen mit PBS und die Inkubation in M-199 Medium (Gibco, USA) bei 4°C um alle zellulären Überreste zu entfernen.

Eine Sterilisation der Klappen erfolgte mit 70% Ethanol für 15 Minuten, gefolgt von weiteren drei Waschzyklen mit PBS und einer Inkubation mit einer antimykotisch und antibakteriell wirkenden Lösung (Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B). Die Klappen wurden bis zur Implantation bei einer Temperatur von 4°C in M-199 Medium (Gibco, USA) gelagert.

2.2 Katheter

Das verwendete Ablagesystem wurde speziell für die Anforderungen der Implantationen entwickelt und bereits in Veröffentlichungen beschrieben [58].

Vereinfacht beschrieben bestand der Katheterschlauch aus einer eng gewickelten Drahtspirale (innerer Katheter), über die sich ein Mantel aus einem thermoplastischen Elastomer (Pebax) legte (äußerer Katheter). An diesem Katheterschlauch waren über Verbindungsstücke an der distalen Seite die Kapsel, in der das Implantat untergebracht wurde und an der proximalen Seite ein Handgriff über den die Freisetzung des Implantats gesteuert werden konnte, befestigt.

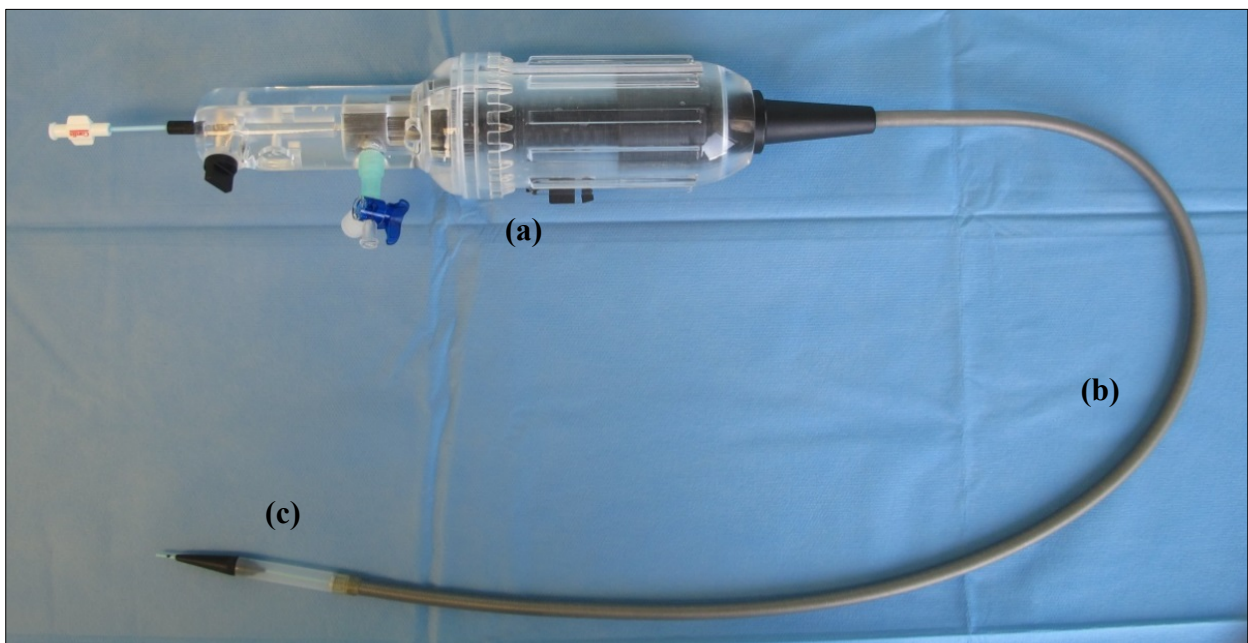


Abbildung 5: Katheterablagensystem, zur Implantation der dTEHV.

Zu sehen sind die drei grundlegenden Abschnitte Handgriff (a), Katheter (b) und die Spitze mit der integrierten Kapsel (c), in welche die dTEHV nach dem Crimping geladen werden.

Durch eine Rotationsbewegung im Handgriff wurde über eine Schraube vermittelt der äußere Katheter über die Längsachse der Drahtspirale zurückgezogen und somit das Implantat aus der Kapsel freigesetzt. Der Innenkatheter bewegte sich hierbei nicht und diente dem Stent als Widerlager, um das Implantat während der Freisetzung an der antizipierten Position zu halten.

Wie oben kurz beschrieben, bildete der äußere Katheter einen Mantel, der sich wie ein Schlauch um den Innenkatheter legt. Dieser bestand aus einer gewickelten, röntgendichten Edelstahlspirale (0,7 mm round wire, 304SS). Der äußere Katheter setzte sich aus einem thermoplastischen Elastomer unterschiedlicher Härte (Pebax, Shore-D 40 am proximalen und Shore-D30 am distalen Teil des Katheters) als Außenseite, einem Edelstahl-Braiding und einer Polytetrafluorethylen-Schicht als Innenschicht zusammen, um die Reibung beim Zurückziehen des Katheters zu minimieren. Die Zusammensetzung der drei Komponenten lässt eine hohe Elastizität zu und stellte gleichzeitig sicher, dass der äußere Mantel beim Zurückziehen nicht zu stark gedehnt wurde. Innerhalb der zentralen Achse der Edelstahlspirale des inneren Katheters wurde ein leicht modifizierter kommerziell erhältlicher 4F-Pigtail Katheter (Cordis, Miami, USA) platziert, um ein Führungsdraht beherbergen zu können. Der Außenkatheter hatte einen Innen-/Außendurchmesser von 6,3 mm/7,3 mm (19 Fr/22 Fr).

Um den Stent inklusive des Klappenimplantats aufnehmen zu können, befand sich am distalen Teil des Katheterschlauches eine Kapsel mit einem Innen-/Außendurchmesser von 8/8,6 mm (24/26 Fr) bzw. 10/10,6 mm (30/32 Fr). Zwischen den Mantel des Außenkatheters und die Kapsel wurde ein Verbindungsstück aus Polyurethan (Shore-A 80) geschaltet, um die verschiedenen Durchmesser zu überbrücken.

Zur besseren Steuerung durch die Herzhöhlen wurde an das distale Ende des Ablagesystems eine konische, röntgendichte Spitze (mit Tungsten-Pulver eingegossen) aus weichem Polyurethan (Shore 60A) gesetzt.

2.3 Tiere und Haltung

Für die Implantationen wurden 16 adulte, weibliche, graue gehörnte Heidschnucken verwendet, sowie zwei weiße hornlose Schnucken. Alle Tiere wurden von Züchtern aus der Region Berlin und Brandenburg bezogen. Die Einnistung erfolgte an der Forschungsabteilung für experimentelle Medizin am Charité Campus Virchow Klinikum, welche nach EN DIN ISO 9001:2000 als Tierexperimentelle Einrichtung zertifiziert ist. Es wurden bei den Versuchen die Normen zum Tierschutz der europäischen und deutschen Gesellschaften für Tierversuchskunde (FELASA, GV-SOLAS) eingehalten, eine entsprechende Genehmigung der Tierschutzbehörde des Landes Berlin LaGeSo liegt mit der Antragsnummer G0111/11 vor.

Zweimal täglich erfolgte eine Fütterung mit Heu, sowie einmal täglich mit einer Kraftfuttermischung. Vor Versuchen wurde das entsprechende Versuchstier für 24 Stunden mittels Maulkorb in der Herde nüchtern gestellt. Die Schafe wurden ausschließlich mit Tieren aus der gleichen Versuchsreihe in einem Stall gehalten. Regelmäßige tierärztliche Visiten und die

Überwachung durch Tierpfleger wurden durchgeführt, um die Gesundheit der Schafe zu gewährleisten.

Die Tiere und Klappen wurden entsprechend der Produktionsreihen der dTEHV A.1-7, B.1-2, C.1-2, D.1-3 und E.1-4 benannt (siehe Tabelle 1).

2.4 Studienprotokoll

Vor der Implantation wurden die Tiere einer Computertomographie und Magnetresonanztomographie unterzogen, um die Größe des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (RVOT), der nativen Klappe und der Pulmonalarterie (PA) zu messen, sowie die Funktionalität der nativen Pulmonalklappe zu ermitteln.

Die Implantation wurde durchgeführt eingerahmt durch Angiographie sowie invasiver Druckmessung der Pulmonalarterie, des rechten Ventrikels und Vorhofes. Ein intrakardialer Ultraschall (intracardiac echocardiography, ICE) vor und nach Ablage der neuen Klappe wurde ebenfalls im Rahmen der Implantation durchgeführt. Eine Woche nach der Implantation erfolgte erneut ein CT und MRT, um die Funktionalität der Klappe und Größenverhältnisse des Stents direkt nach der Implantation beurteilen zu können.

Alle vier Wochen nach dem Zeitpunkt der Implantation sollten Messungen der Funktionalität per ICE und MRT erfolgen. Vor der Explantation wurden ein weiteres Mal CT und MRT durchgeführt, woraufhin die Explantation erfolgte, wieder begleitet durch eine Angiographie, invasive Druckmessungen und einen abschließenden ICE. Als Abbruchkriterium des Versuchs wurde eine Regurgitationsfraktion von $>30\%$ im MRT in Verbindung mit einem echokardiographischen Korrelat definiert. Trat ein Abbruchkriterium auf, so wurde das Tier zum nächsten Follow-Up Termin euthanasiert, frühestens jedoch nach 8 Wochen. Spätestens 12 Monate nach Implantation wurden alle Klappen explantiert. Abbildung 6 gibt einen Überblick über das definierte Studienprotokoll. Die einzelnen Schritte des Versuches werden im Verlauf genauer beschrieben.



Abbildung 6: Schema über den Versuchsablauf.

Implantation und Explantation wurden von einer Angiographie des rechten Ventrikels und der Pulmonalarterie, sowie einer intrakardialen Ultraschalluntersuchung begleitet.

2.5 Lagerung während der Eingriffe

Im Rahmen der Implantation und Explantation, sowie bei den ICE-Untersuchungen wurden die Tiere auf dem Rücken gelagert. Vorder- und Hinterläufe wurden gepolstert und durch Zugbinden aus dem Operationsgebiet ausgelagert. Während der MRT- und CT- Untersuchungen befanden sich die Tiere in Bauchlage.

2.6 Anästhesie

Bei jedem Eingriff wurden die Schafe ca. 20 Minuten vor der Narkoseeinleitung mit Midazolam 0,4 mg/kg i.m. (Dormicum®, Roche, Wien, Österreich) und Butorphanol 0,4 mg/kg i.m. (Alvegesic®, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) prämediziert. Zusätzlich erhielten die Tiere bei allen Untersuchungen, die ohne Inhalationsnarkose durchgeführt wurden 0,005 mg/kg Medetomidin i.m. (Domitor®, Orion Corporation, Espoo, Finland). Anschließend wurde das zu untersuchende Tier zur Narkoseeinleitung sitzend gelagert.

Für die Narkoseführung wurden je nach Eingriff verschiedene Narkoseprotokolle verwendet. Für ICE-, MRT und CT-Untersuchungen wurde eine totale intravenöse Anästhesie (TIVA), bei Explantation und Implantation jeweils eine balancierte Anästhesie angewandt.

Für beide Arten der Narkoseführung erfolgte die Einleitung nach Anlage intravenöser Zugänge durch langsame Injektion von 0,5-1 mg/kg Propofol i.v. (Propofol-Lipuro 1%®, Braun, Melsungen, Deutschland) unter Pulsoxymeter- und Atemüberwachung. Sobald die Tiere das Narkosestadium erreicht hatten, erfolgte die Anlage eines endotrachealen Tubus beim noch spontan atmenden Tier mit anschließender Blockung und Fixierung des Tubus.

Nach der beschriebenen Narkoseeinleitung wurden im Rahmen der Injektionsnarkose 7,0-8,0 mg/kg/h Propofol i.v. (Propofol-Lipuro 1%®, Braun, Melsungen, Deutschland), sowie 3-15 mg/kg/h Ketamin i.v. (Ketamin-Actavis®, Actavis, München, Deutschland) kontinuierlich über einen Perfusor verabreicht.

Während der Inhalationsnarkosen für Eingriffe der Implantation und Explantation wurden nach der bereits beschriebenen Einleitung Propofol 6-12 mg/kg/h i.v. und Fentanyl 0,005-0,015 mg/kg/h (Fentanyl Janssen, Neuss, Deutschland) kontinuierlich über einen Perfusor verabreicht. Anschließend folgte eine volumenkontrollierte Beatmung im IPPV-Modus (intermittent positive pressure ventilation) mit Isofluran 1,2-2% (Forene®, Abbott GmbH und Co KG, Wiesbaden, Deutschland) unter etCO₂-Monitoring, O₂ 5 l/min einer Atemfrequenz von 16-22/min und einem

Atemzugvolumen von 8-15 ml/kg über ein Beatmungsgerät (Cato®, Dräger, Lübeck, Deutschland). Ab einer Isofluran F_{ec} von 1,4% wurde die Propofol-Gabe beendet.

Zur Erhaltung eines optimalen Flüssigkeitshaushaltes wurden 5-10 ml/kg Vollelektrolytlösung (Jonosteril®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) i.v. über einen Zeitraum von 60 Minuten infundiert. Zur Bilanzierung des Flüssigkeitshaushaltes wurde ein Blasenkatheter gelegt. Während der Narkose wurde ein Monitoring der Vitalparameter mittels Pulsoxymetrie, einem 5-Kanal-EKG sowie rektaler Temperaturmessung durchgeführt.

Im Rahmen der Implantationen wurde vor Ablage des Klappenimplantats eine Heparindosis von 100 IE/kg i.v. (Heparin Natrium 5000-Ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) appliziert. Während der Explantation wurde vor der Euthanasie der Tiere ebenfalls Heparin 100 IE/kg i.v. (Heparin Natrium 5000-Ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) infundiert.

Die Euthanasie der Tiere im Rahmen der Explantation erfolgte durch die Gabe eines Propofol-Bolus von 5 mg/kg KG i.v. (Propofol-Lipuro 1%®, Braun, Melsungen, Deutschland) und Kaliumchlorid 0,013 mmol/kg KG i.v. (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland).

2.7 Implantation

Nach Einleitung der Narkose, erfolgte ultraschallgesteuert (Vivid q Ultrasound Machine, GE Healthcare, Chicago, USA) die Anlage einer 4 Fr- bzw. 5 Fr-Schleuse (St. Jude Medical, St. Paul/Minnesota, USA) in die linke A. femoralis und V. femoralis. Die venöse Schleuse wurde im weiteren Verlauf der Implantationsprozedur für das Einbringen des Angiographiekatheters, die arterielle Schleuse zur Blutdruckmessung genutzt. Danach wurde eine 11 Fr-Schleuse (St. Jude Medical, St. Paul/Minnesota, USA) in die rechte V. jugularis installiert, welche später als Zugang für die Sonde des intrakardialen Ultraschalls diente.

Im Anschluss an die Anlage der Schleusen wurden 100 IE Heparin/kg KG i.v. gegeben mit einer Kontrolle der ACT (activated clotting time) direkt vor und 10 Minuten nach der Applikation, um die Entstehung von Thromben während der Implantation zu verhindern.

Es wurden darauffolgend ein intrakardialer Ultraschall (siehe 2.9.1), invasive Druckmessungen (Eagle 4000, Marquette Hellige, Freiburg, Germany) und eine Angiographie der rechten Herzkammer, sowie der Pulmonalarterie durchgeführt. Hierzu wurde Kontrastmittel (Iomeron® 400 MCT, Bracco Imaging, Konstanz, Deutschland) verwendet.

Für die Implantation der Klappe über oben beschriebene Ablagesystem wurde der Zugang in der rechten V. jugularis unter voriger subkutaner Applikation von Lidocain (Braun, Melsungen, Deutschland) nach Anlage einer Tabaksbeutelnaht (Vicryl 2-0, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) sukzessive auf eine Größe von 32 F erweitert. Für die Erweiterung

wurden kommerziell erhältliche Dilatoren (Edwards Lifescience Corporation, Irvine, USA) verwendet. Um in die Kapsel des Ablagesystems aufgenommen werden zu können, musste der Klappenstent einem Crimping-Vorgang unterzogen werden. Hierbei wurde der Stent mit eingenähter dTEHV in einem speziellen Crimping-Gerät (Edwards Lifescience Corporation, Irvine, USA) plaziert, wonach durch kontinuierliche Verengung der Blende der Durchmesser des Stents auf 10 mm (bei Tieren > 45 kg Körpergewicht bzw. 8 mm (bei Tieren < 45 kg Körpergewicht) reduziert wurde, entsprechend der Größe der verwendeten Kapsel des Ablagekatheters.

Nach Einbringen des Klappenstents in das Ablagesystem wurde die Kapsel entlang eines über einen Pigtail-Katheter vorgelegten Führungsdrahtes (Amplatz Ultra-Stiff Wire Guide, Ultra-Stiff 2, Curved – PTFE-Coated Stainless Steel; William Cook Europe, Bjaeverskov, Denmark) bis auf Höhe der nativen Pulmonalklappe vorgeschoben. Positionskontrollen des Stents erfolgten intermittierend über Durchleuchtung mit einem Röntgen-C-Bogen (BV Pulsera, Phillips Healthcare, Eindhoven, Niederlande). Sobald die gewünschte Position der Kapsel erreicht war wurde der Stent nach einer Kontrollangiographie über der nativen Pulmonalklappe abgelegt. Die Klappensegel der nativen Pulmonalklappe wurden dabei durch die Radialkraft des Stents zwischen diesen und die Gefäßwand der Pulmonalarterie gedrückt, während sich die dTEHV im Stent aufspannte. Die native Pulmonalklappe hatte daher keinen Einfluss mehr auf die Hämodynamik zwischen der rechten Herzkammer und Pulmonalarterie. Nach Applikation des Klappenstents wurde das Ablagesystem entfernt und erneut eine 11F-Schleuse in der rechten V. jugularis an derselben Punktionsstelle installiert, welche durch die Tabaksbeutelnaht gesichert wurde.

Im Anschluss wurden zur Kontrolle ein intrakardialer Ultraschall, pulmonalarterielle Druckmessungen und eine Angiographie der Pulmonalarterie sowie des rechten Ventrikels durchgeführt und die Klappenfunktion angiographisch qualitativ bewertet.

Nach Abschluss der Implantationsprozedur und Entfernen aller Schleusen, erfolgte die Gabe einer antibiotischen Prophylaxe mit Ampicillin/Sulbactam 3g i.v. (Unacid®, Pfizer, Berlin, Deutschland). Eine Antikoagulation wurde noch 5 Tage nach der Implantation fortgeführt mit Acetylsalicylsäure 100 mg/Tag (ASS-ratiopharm®; ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) und Daltetrapin 350 U/kg/d s.c. (Fragmin®; Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland).

2.8 CT

EKG-getriggerte Computertomographien (Somatom® Definition Flash, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) wurden eine Woche vor und nach Implantation durchgeführt, sowie eine Woche vor

Explantation. Die Schichtdicke betrug 0,75 mm, Kontrastmittelinfusionen von 2 – 2,5 ml/kg (Iomeron® 400 MCT, Bracco Imaging, Konstanz, Deutschland) wurden intravenös appliziert.

Die Auswertung der angefertigten Bilder wurden mit der Software syngo VE31H (Siemens AG, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden die Größenverhältnisse des rechtsventrikulären Ausflusstraktes, der nativen Pulmonalklappe, des postvalvulären Bulbus, sowie der Pulmonalarterie vor Implantation bestimmt. Der mittlere Durchmesser der Strukturen wird aus dem Mittelwert des maximalen und minimalen Durchmessers gebildet. Nach der Implantation wurden Durchmesser und Ovalität des implantierten Stents gemessen. Die zu untersuchenden Tiere befanden sich während der Durchführung der Computertomographien in Bauchlage.

2.9 Follow-up

Um die Funktion der dTEVH im Verlauf beurteilen zu können, wurden die Schafe alle vier Wochen Nachfolgeuntersuchungen unterzogen. Hierbei wurde zur semiquantitativen und qualitativen Bewertung ein intrakardialer Ultraschall (ICE), sowie zur quantitativen Bewertung eine kardiale Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt.

2.9.1 Intrakardialer Ultraschall (ICE)

Intrakardiale Ultraschalluntersuchungen wurden transvenös durch einen Zugang an der Vena jugularis externa durchgeführt. Nach Punktion und Anlage einer 11 Fr Schleuse wurden 8 Fr bzw. 10 Fr Ultraschallsonden (AcuNav, Siemens, Erlangen, Deutschland) an einem tragbaren Ultraschallgerät (Vivid q Ultrasound Machine, GE Healthcare, Tirat Carmel, Isreal) verwendet.

Die Trikuspidalklappe wurde vom rechten Vorhof aus im Längsschnitt geschallt und auf Insuffizienzen, sowie das Öffnungs- und Schlussverhalten der Klappe hin untersucht. Hierzu wurden 2d greyscale cine loops, color flow mode (CFM) cine loops, sowie continuous wave doppler Sequenzen aufgezeichnet. Die Pulmonalklappe wurde vom rechten Vorhof aus im Transversalschnitt, sowie vom RVOT des rechten Ventrikels aus im Längsschnitt betrachtet. Es wurden Sequenzen zur umfassenden Beurteilung der Klappe herangezogen. Im 2D-greyscale cineloop wurde das Öffnungs- und Schlussverhalten der Klappe hinsichtlich der Fragestellung erfasst, ob die native Pulmonalklappe vollständig überstentet ist, alle Klappensegel der dTEHV frei beweglich sind und es eine ausreichende Koaptation an den Klappensegeln gibt. Zusätzlich wurde nach weiteren Auffälligkeiten wie etwa Vegetationen, Signalanhebungen, oder Verdickungen an den Klappensegeln gesucht. Anhand CFM-Sequenzen wurden Insuffizienzjets

aufgezeichnet und deren Morphologie beurteilt. Als zusätzliche Parameter wurden die Vena Contracta und die PISA (proximal isovelocity surface area) Methode herangezogen. Die Vena contracta beschreibt den relativen Durchmesser des Regurgitationsjets im Bezug auf den Klappendurchmesser und wird in Prozent angegeben. Um schwere von mittleren Insuffizienzen besser abgrenzen zu können, wurde zusätzlich die pressure half time (PHT) genutzt [59]. Ab einer PHT < 100 ms wurde von einer hämodynamisch relevanten bzw. schweren Insuffizienz ausgegangen, insofern die Klappe mindestens als moderat insuffizient eingestuft wurde. Continuous-wave und pulsed-wave Doppler Sequenzen (CW- und PW-Doppler) durch die Pulmonalklappe wurden aufgezeichnet.

Alle Messungen wurden nach allgemein gültigen Kriterien zur Messung von Klappeninsuffizienzen und –stenosen aufgezeichnet und beurteilt [60-62]. Insuffizienzen wurden anhand dieser Kriterien in die Kategorien „keine“, „leicht“, „moderat“ und „schwer“ nach folgendem Schema eingeteilt:

| Parameter | Leicht | Moderat | Schwer |
|---|--|------------------|---|
| Jetbreite im CFM | klein, <10 mm Länge mit schmalem Ursprung | dazwischen | groß, mit breitem Ursprung |
| Regurgitationsfluss in der PA | keiner | keine | vorhanden |
| Pulmonalarterieller vs. Aortenfluss im PW-Doppler | normal, eventuell leicht erhöhter PA-Fluss | dazwischen | PA-Fluss deutlich erhöht |
| Signal des Regurgitationsjets im CW-Doppler | blass, langsame Geschwindigkeitsabnahme | kompakt/variabel | kompakt, schnelle Geschwindigkeitsabnahme/frühes Ende des diastolischen Flusses |
| PHT | nicht definiert | nicht definiert | <100 ms |
| Verhältnis der Jetbreite zum RVOT | nicht definiert | nicht definiert | >50-65% |

Tabelle 2: Kriterien zur Bewertung pulmonalarterieller Klappeninsuffizienzen nach ESC-Kriterien [60].

Während der ICE-Untersuchungen wurden die Tiere in Rückenlage positioniert. Der venöse Zugang durch die Schleuse in der Vena jugularis wurde nach Beenden der Untersuchung durch eine Hautnaht (Vicryl 2-0, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verschlossen.

2.9.2 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die zu untersuchenden Tiere befanden sich während der Durchführung der MRT in Bauchlage.

Zur exakten Quantifizierung des Flusses durch Aorta und Pulmonalklappe nach Goldstandard [63, 64] wurden kardiale Magnetresonanztomographien mit einem 1,5 bzw. 3 Tesla MRT (Achieva 2.6, 5-channel cardiac coil, Phillips Medical Systems, Best, Niederlande) durchgeführt. Zur Messung des zweidimensionalen quantitativen Flusses (2D-Q-Flow, PA-QF) wurden geschwindigkeitskodierte Phasen-Kontrast Sequenzen im Hauptstamm der Pulmonalarterie direkt hinter der distalen Stentkante, sowie der Aorta ascendens distal der Abgänge der Koronararterien angefertigt. Hierbei wurde das Blutvolumen gemessen, welches während eines Herzzyklus in der Systole antegrad und in der Diastole retrograd durch den proximalen Teil der Pulmonalarterie fließt. Aus den jeweiligen Volumina des antegraden und retrograden Flusses ergibt sich eine Fraktion, welche das Regurgitationsvolumen im Bezug zum Schlagvolumen des Herzens beschreibt. Die Regurgitationsfraktion wird anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Regurgitationsfraktion (\%)} = \frac{\text{Volumen}_{\text{retrograd}}}{\text{Volumen}_{\text{antegrad}}} \times 100$$

Zur Bestimmung des RV-Volumen wurden EKG-getriggerte CINE-Sequenzen in der kurzen Achse des Herzens (SAX, short axis) angefertigt (Simpson's Methode). Hierzu wurde ein Kontraktionszyklus des Herzens in 25 Phasen aufgenommen und das zu untersuchende Herz in 27 Schichten der kurzen Achse aufgeteilt. Vor Aufnahme der SAX oder PA-QF Sequenzen wurde eine Übersichtsaufnahme (survey) angefertigt.

Die quantitative Auswertung der Flussequenzen und volumetrischen Messungen anhand der CINE-Sequenzen erfolgte durch eine kommerziell erhältliche kardiovaskuläre MRT- und CT-Nachbearbeitungssoftware (cvi 42 Version 5.1.2, Circle Cardiovascular Imaging, Calgary, Canada).

Folgende Einstellungen wurden an der Maschine vorgenommen um die Sequenzen aufzunehmen.

- SAX: B-FFE (balanced fast field echo) Sequenz, retrograd R-Zacken getriggert. FOV (field of view) feet-head 160 mm x right-left 151 mm x anterior-posterior 108 mm. Voxel size 1,2 x 1,2 x 4 mm. NSA (number of signal acquisitions) 3. 27 slices. Slice thickness 4 mm, no gap. No fold-over suppression. Flip angle 60°. TR (time to repeat): shortest. TE (time to echo): shortest. Shim volume, but no shim alone. R triggered.
- PA-QF: T1-FFE Sequenz, retrograd R-Zacken getriggert. FOV right-left 150 mm x feet-head 141 mm. Voxel size right-left 2,34 mm x feet-head 1,99 mm x anterior-posterior 4 mm. NSA 1. Slice thickness 4 mm. Folder-over suppression: oversampling. Fold-over

direction: Feet-head. Reconstruction matrix 128, no SENSE. Time to Echo (TE): shortest. Flip angle 15°. TR: shortest. 25 Rekonstruktionsphasen. Phase contrast velocity 150 cm/s.

2.10 Explantation

2.10.1 Explantationszeitpunkte

Als Abbruchkriterium wurde eine Regurgitationsfraktion der implantierten dTEHV von >30% in den Flussmessungen des MRT an zwei aufeinander folgenden Untersuchungensterminen von 4 Wochen definiert und/oder eine offensichtliche klinische Beeinträchtigung des Wohls der Schafe nach den Score-Kriterien des Tierversuchsantrages. Sobald ein Tier eines dieser Kriterien erfüllte, wurde zum nächsten Follow-Up Termin die Explantation der Klappe veranlasst, frühestens jedoch 2 Monate nach Implantation. Spätestens nach einer Nachbeobachtungszeit von 12 Monaten wurden die Klappen explantiert.

2.10.2 Explantationsprozedur

Nach wie in 2.6 beschriebener erfolgter Einleitung, wurden die Tiere zur Explantation in Rückenlage auf dem Operationstisch gelagert. Ultraschallgesteuert erfolgte die Punktion der linken V. und A. femoralis, sowie die Anlage einer 5F- und 4F-Schleuse (St. Jude Medical, Minnetonka, USA) über die wie während der Implantationsprozedur in 2.7 beschrieben, Blutdruckmessungen und eine Angiographie des rechten Herzens durchgeführt wurden. Ebenso erfolgte erneut die Punktion der rechten V. jugularis und die Anlage einer 11F-Schleuse (St. Jude Medical, Minnetonka, USA), welche später als Zugang für die Ultraschallsonde des intrakardialen Ultraschalls diente. Danach folgte die Durchführung arterieller Blutdruckmessungen, eine Angiographie der rechten Herzkammer, sowie der Pulmonalarterie und ein intrakardialer Ultraschall nach dem in 2.9.1 beschriebenen Schema. Anschließend wurden zur Unterbindung der Gerinnung 100 IE Heparin/kg i.v. appliziert, sowie zur Euthanasie Propofol 5 mg/kg i.v. (Propofol-Lipuro 1%®, Braun, Melsungen, Deutschland) und Kaliumchlorid 0,013 mmol/kg i.v. (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland). Nach Feststellung des Todes, wurde der Brustkorb des Tieres durch eine Thorakotomie eröffnet. Herz und Lungen wurden an den großen Gefäßen abgetrennt und im Paket steril aus dem Situs entfernt. Danach wurde der Tierkadaver sachgemäß entsorgt.

2.11 Makroskopische Begutachtung

Herz inklusive Perikard wurden von den Lungenflügeln getrennt und wurden auf das Vorliegen eines Perikardergusses oder Infektzeichen untersucht. Eventuelle Perforationen der oberen Stentspitzen durch die Pulmonalarterie wurden gegebenenfalls dokumentiert. Es folgte die Entfernung des Perikards, sowie die Eröffnung der Herzhöhlen um die Stentposition in Bezug zum rechten Ventrikel und zur Pulmonalarterie zu begutachten. Im Anschluss wurde der Stent inklusive des proximalen Anteils der Pulmonalarterie aus dem Herzen herausgeschnitten. Die Morphologie der Klappensegel innerhalb des Stents wurde sowohl von der proximalen, als auch der distalen Seite des Stents beurteilt und auf das Vorliegen von Thromben oder anderen Vegetationen auf den Klappensegeln und dem restlichen Konduit geprüft. Nachfolgend wurde der Stent entlang seiner Längsachse zwischen dem, von der Aorta aus gesehen, rechts- und linkslateralen Klappensegel aufgetrennt. Im aufgeklappten Stent wurde die Tiefe der Hinge-Region als die Strecke vom Oberrand der Klappensegel bis zum tiefsten Punkt der Hinge-Region eines jeden Segels gemessen. Zusätzlich erfolgte die genaue Untersuchung der Klappensegel auf mechanische Defekte, wie etwa Löcher oder Schwachstellen im Gewebe.

Alle Befunde wurden auf einer Unterlage mit größenskaliertem Raster fotodokumentiert.

2.12 Histologie

Angewandt wurde die „Trenn-Dünnschliff-Technik“ [65], um die histologischen Präparate herzustellen. Hierbei wurden nach Einbettung der Präparate in Kunstharz (Methylmethacrylat, Technovit 9100, Kulzer & Co, Wehrheim, Deutschland) 200 µm dicke Schnitte mit Hilfe einer Diamantbandsäge (300 CP, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) erzeugt. Darüber hinaus wurden diese Schnitte mittels eines Mikroschleifsystems (400 CS, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) auf eine Stärke von 20 µm reduziert, um die so entstandenen Semidünnschnitte weiter lichtmikroskopisch beurteilen zu können.

Die Anfärbung erfolgte mit Richardson Blue (Standardfärbung), sowie immunhistochemischer Färbungen mit Antikörpern, welche in Tabelle 3 dargestellt sind (Gegenfärbung: Hämalalaun), Movat-Pentachrom zur Identifizierung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und bei 6 Präparaten eine Kossa-Färbung zur Kalkdetektion.

Die histologische Begutachtung erfolgte durch ein Lichtmikroskop (Leica DM LB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Mit Hilfe eines Scanning Mikroskops (Olympus BX51, Dotslide-System, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) wurden digitale

Bilder der Präparate angefertigt, welche mit der Software OlyVIA (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland) befundet und gespeichert wurden.

Gegenstand der Beurteilung waren Struktur und Stärke der Klappensegel, Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, Ausmaß und Charakterisierung einer Re-Endothelialisierung, Einwachsen des Stents und die Apposition des Scaffolds an die Pulmonalarterienwand. Desweiteren wurden die Präparate auf das Vorhandensein von Verkalkungen, Thromben oder anderer Auflagerungen und Nekrosen untersucht. Das der Aorta zugewandte Segel wurde für die Histologie verwendet.

| Primärer Antikörper | Verdünnung | Antigenentfernung | Sekundärer Antikörper | Zielstruktur |
|--|------------|----------------------------------|--|---------------------|
| Maus, anti-Mensch SMA, Klon 1A4 (Dako) | 1:50 | Zitratpuffer pH 6, 40 Minuten | Kaninchen, anti-Maus Immunglobulin A4 (Dako) 1:100 verdünnt | Glatte Muskelzellen |
| Polyklonaler Kaninchen, anti-Mensch vWF (Dako) | 1:400 | Zitratpuffer pH 6, 40 Minuten | Schwein anti Hase, Immunglobulin-Antikörper (Dako) 1:100 verdünnt | Endotheliale Zellen |
| Polyklonaler Kaninchen anti-Mensch-CD3 (Dako) | 1:100 | Zitratpuffer pH 6, 40 Minuten | Polyklonales Kaninchen anti-Ziege Immunglobulin/Pferde Meerrettichperoxidase 1:100 verdünnt | T-Lymphozyten |
| Monoklonaler Maus-anti-Mensch CD79acy Klon HM57 (Dako) | 1:100 | Tris/EDTA, pH 9, 20 Minuten | Kaninchen anti Maus Immunglobulin 1:100 | B-Lymphozyten |

Tabelle 3: Antikörper zur Herstellung immunhistochemischer Färbungen und deren Zielstrukturen.

2.13 Statistik

Statistik, Grafiken und Ergebnisse wurden mit Microsoft Excel (Microsoft Office 2016, Version 15.27) und SPSS (IBM® SPSS® Statistics Version 21, IBM Deutschland GmbH) erstellt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem Konfidenzintervall von 95% entsprechend $p \leq 0,05$ bewertet. Werte der deskriptiven Statistik sind mit Mittelwert \pm Standardabweichung

(Standardabweichung = $\sqrt{\frac{\sum(x-x^2)}{n}}$) oder als Median (Interquartilsabstand). Der

Interquartilenabstand bezieht sich auf das Intervall in dem 50% der Datenelemente liegen. Zur Darstellung der Daten werden Box-Whisker Plots verwendet, wobei 50% der Datenelemente in der Box, innerhalb der Grenzen der Whiskers 95% der Datenelemente liegen. Ausreißende Daten werden als einzelne Datenpunkte angezeigt.

2.14 Tierschutz & Ethik

Ein Versuchsantrag mit der Nummer G0111/11 wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin bewilligt. Alle Versuche erfolgten gemäß der Richtlinien der europäischen und deutschen Gesellschaften für Versuchstierkunde (FELASA, GV-SOLAS) in einer nach EN DIN ISO 9001:2000 zertifizierten Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin.

Es wurden die Kriterien zur guten wissenschaftlichen Praxis an der Charité – Universitätsmedizin Berlin beachtet und eingehalten.

3 Ergebnisse

3.1 Implantation

Von den durchgeführten 18 Implantationen gelangen 15 ohne Komplikationen. Ein Schaf (72, dTEHV A.7) erlitt kurz nach Ablage des Klappenstents eine ventrikuläre Fibrillation, wurde hämodynamisch instabil und musste anschließend nach erfolgloser Reanimation euthanasiert werden. Schaf 51 (dTEHV A.1) erlitt perioperativ ein großes Hämatom an der Leiste, sowie starke innere Blutungen und musste 6 Tage nach Implantation euthanasiert werden, die Implantation selbst verlief jedoch ohne Probleme.

Die Klappe des Schafs 60 (dTEHV D.1) wurde zu weit distal abgelegt, sodass die native Pulmonalklappe nicht überstentet wurde. Die Folge waren zwei in Reihe geschaltete Pulmonalklappen in der Ausflussbahn des rechten Herzens.

Die Ergebnisse der Implantationen beziehen sich demzufolge auf die Summe der restlichen 15 Tiere, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

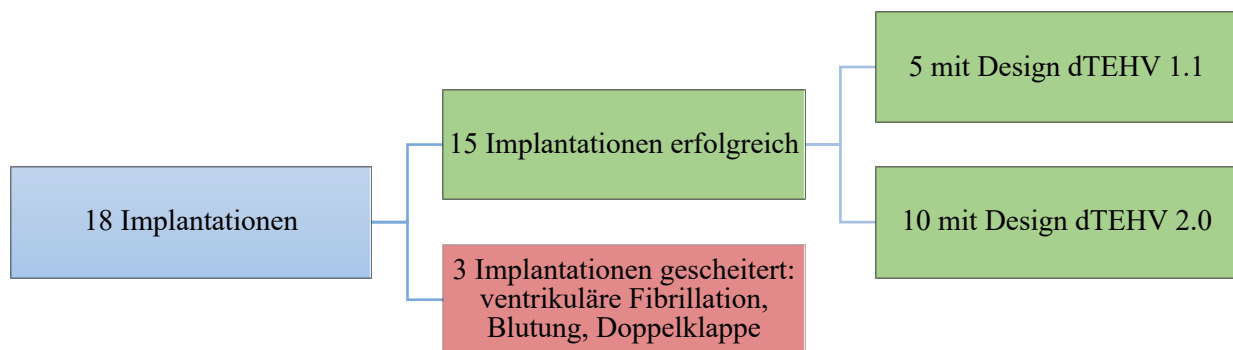


Abbildung 7: Übersicht über die Implantationen der weiterentwickelten dTEHV.

Während der Implantationen der Tiere 52-56 (dTEHV A.2-6) traten aufgrund der Klappenmorphologie Komplikationen auf. Während des Crimpings der Klappen wurden teilweise mutmaßlich Segelstrukturen verletzt aufgrund einer sehr zarten Gewebeformation. Diese dTEHV zeigten direkt nach Implantation schwere Insuffizienzen, sowie bei Explantation Defekte in den Klappensegeln. Hierbei handelte es sich um die ersten Implantationen von dTEHV mit der neuartigen Geometrie, einer ersten Weiterentwicklungsstufe, eine dTEHV1.1. Bei Tier 54 (A.4) und 56 (A.6) wurde zusätzlich während des Rückzugs der Katheterspitze vermutlich ein Segel verletzt. Die Folge waren bereits initial moderate bis schwere echokardiographisch feststellbare

Insuffizienzen der neu implantierten dTEHV (siehe 3.1.4). Dementsprechend wurde das Protokoll in der Herstellung der dTEHV im Bioreaktor, sowie das Design der Katheterspitze angepasst um eine weitere Entwicklungsstufe (dTEHV2.0) zu produzieren. Die folgenden drei Produktionsreihen an dTEHV2.0 hielten dem Crimping-Prozess ohne Probleme stand und die Klappen konnten ohne Beschädigungen der Klappenstruktur implantiert werden (Abbildung 7).

3.1.1 Eigenschaften der Tiere und verwendete Materialien

Die 15 Schafe hatten zum Zeitpunkt der Implantation ein Gewicht von $43,1 \pm 4,8$ kg. Die mittlere Dauer der Implantationsprozedur betrug 3:27 Stunden \pm 37 Minuten. Von den implantierten dTEHV konnten 5 in eine 8 Fr-Kapsel des Ablagekatheters geladen werden, 10 Klappen wurden in eine 10 Fr-Kapsel geladen. Die implantierten Nitinolstents wiesen alle einen Durchmesser von 30 mm auf, 5 Stents wurden mit einer Länge von 33 mm implantiert, 10 mit einer Länge von 30 mm.

3.1.2 Implantationsprozedur

Die Implantationsprozedur wurde mittels Durchleuchtung durchgeführt. Während des Vorschubs des Ablagekatheters traten intermittierend ventrikuläre Extrasystolen bei einigen Schafen auf, jedoch blieben die Tiere hierbei kreislaufstabil.

Zusätzlich wurde eine Kontrastmittel-Angiographie zur Funktionskontrolle direkt vor und direkt nach der Ablage des Klappenstents angefertigt. Die Funktion der meisten dTEHV war initial gut in der KM-angiographischen Kontrolle.

Bei Tier 52 (dTEHV A.2) und 53 (dTEHV A.3) lag eine leichte valvuläre Regurgitation vor, bei Schaf 58 (dTEHV B.2) und 61 (dTEHV C.1) wurde eine leichte Regurgitation in den RVOT in der KM-Angiographie festgestellt. Bei Schaf 63 (dTEHVC.2) war eine deutliche Regurgitation des Kontrastmittels in den RVOT zu erkennen.

Es konnten keine relevanten Stenosen festgestellt werden. Alle anderen Klappen zeigten angiographisch keine Insuffizienzen.

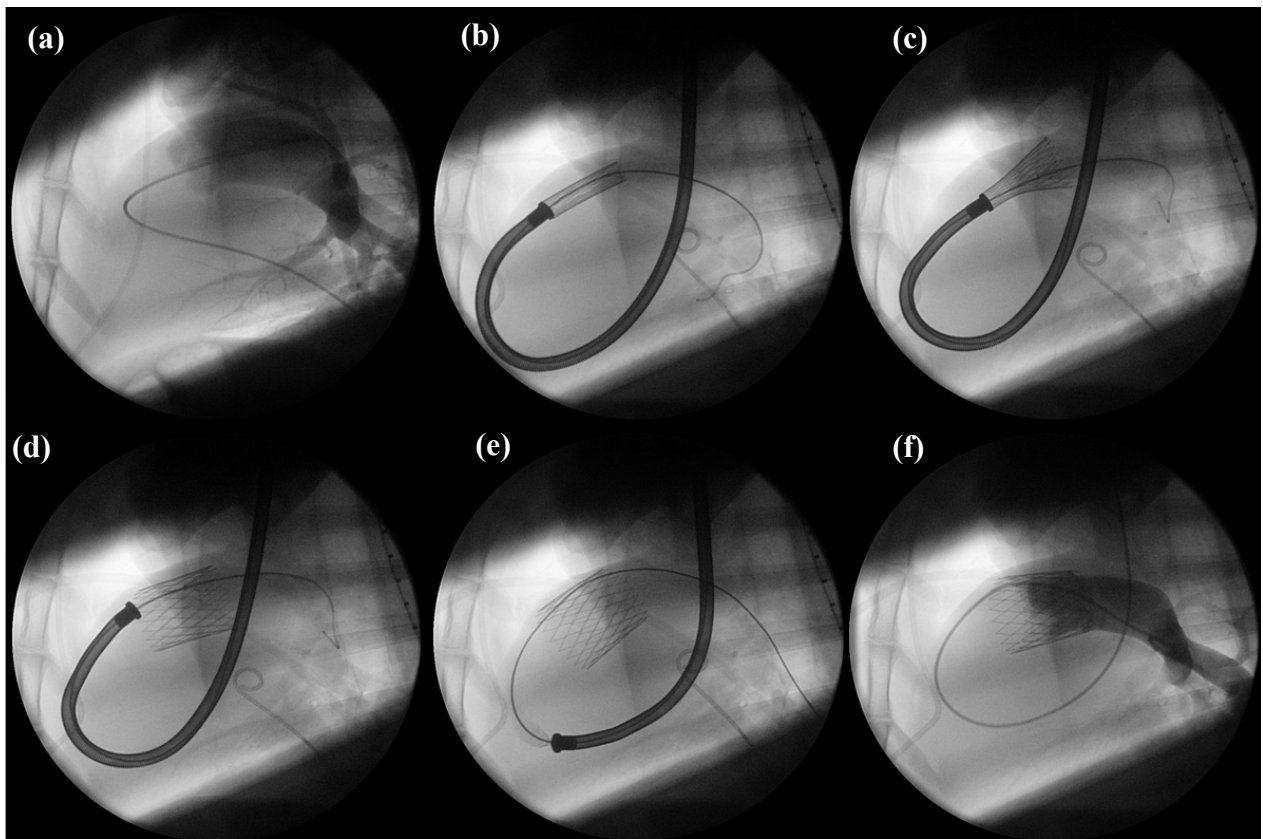


Abbildung 8: Darstellung der Stentablage mittels Durchleuchtung.

(a) = Kontrastmittel-Angiographie der nativen Pulmonalklappe. (b) = Vorschub des Ablagekatheters; der Stent ist in der Kapsel des Katheters gelagert. (c) = Freisetzen des Stents durch Rückzug des äußeren Kathetermantels. (d) = Frei entfalteter Stent mit dTEHV über der nativen Pulmonalklappe. (e) = Rückzug des Ablagekatheters. (f) = Kontrastmittel-Angiographie der neu implantierten dTEHV; suffizienter Schluss.

3.1.3 Initiale Klappenfunktion

Eine intrakardiale Echokardiographie wurde direkt vor und direkt nach Ablage der dTEHV durchgeführt. Dies diente dem unmittelbaren Erfassen der Klappenfunktion und ermöglichte einen direkten Vergleich der dTEHV zur nativen Pulmonalklappe.

Die Klappen zeigten ein gutes Öffnungsverhalten direkt nach Implantation. Dies spiegelt sich in den Werten der maximalen Flussgeschwindigkeit des antegraden Flusses in der Pulmonalarterie wider (Tabelle 4). Insgesamt ergab sich eine signifikante Steigerung der Druckgradienten und maximalen Flussgeschwindigkeit, jedoch sind die Werte absolut gesehen nicht erhöht, daher ergibt sich kein Anhalt für eine Stenosierung der frisch implantierten dTEHV.

| Parameter aus dem CW-Doppler im ICE (n = 14) | nativ | nach Implantation | p-Wert (nach Wilcoxon) |
|--|-------------|-------------------|------------------------|
| PvVmax in m/s | 0,77 (0,15) | 0,91 (0,39) | 0,025* |
| PvMaxPG in mmHg | 2,39 (0,91) | 3,14 (2,83) | 0,033* |
| PvMeanPG in mmHg | 0,84 (0,37) | 1,24 (1,42) | 0,011* |

Tabelle 4: Ergebnisse des maximalen antegraden Flusses durch die Pulmonalarterie (Vmax).

Es gibt keinen Anhalt für eine Stenose. PvVmax = maximaler Vorwärtsfluss in der Pulmonalarterie. PvMaxPG = maximaler Druckgradient über der Pulmonalklappe. PvMeanPG = mittlerer Druckgradient über der Pulmonalklappe. Es ist ein zwar geringer, aber dennoch signifikanter Unterschied der Parameter vor und nach Implantation zu beobachten. Bei Schaf 52 konnte aufgrund einer defekten Ultraschallsonde kein nativer CW-Doppler aufgezeichnet werden, deshalb bezieht sich der Vergleich auf die Summe von n = 14 Messungen.

Die dTEHV wiesen insgesamt eine gute Funktionalität bezüglich des Schlussverhaltens in der ICE direkt nach Implantation auf. Da wie zuvor erwähnt die zu implantierenden Klappen der Tiere 52, 54 und 56 (dTEHV A.2/4/6) vermutlich im Verlauf des Implantationsprozesses beschädigt wurden, war das Schlussverhalten dieser Klappen auch initial schlechter. Bei allen 3 Tieren wurde eine moderate Klappeninsuffizienz direkt nach Implantation festgestellt. Abbildung 9 zeigt die Verteilung der Insuffizienzgrade im ICE direkt nach Implantation. Von den Klappen der drei nachfolgend implantierten Produktionsreihen präsentierten sich acht dTEHV2 mit keiner und zwei dTEHV2 mit einer lediglich leichten Insuffizienz im ICE [60].

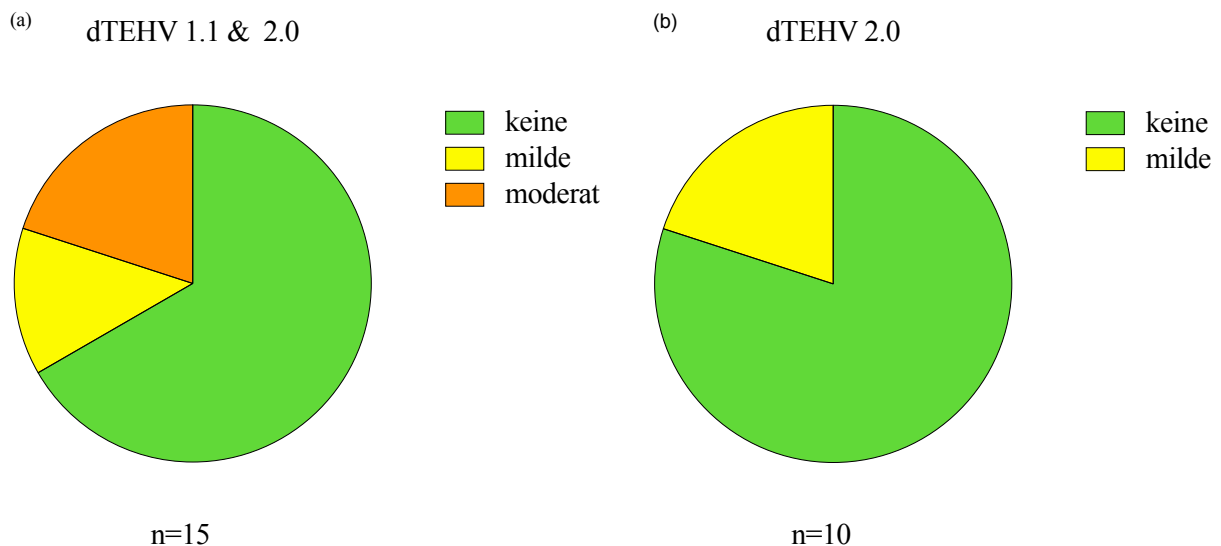


Abbildung 9: Insuffizienzgrade der dTEHV direkt nach Implantation.

(a) Die Insuffizienzgrade aller 15 erfolgreichen Implantationen sind eingeschlossen. (b) Nur die Insuffizienzgrade der dTEHV2.0 sind eingeschlossen. Es sind keine schweren Insuffizienzen aufgetreten.

3.2 Follow-up

Wie bereits zuvor beschrieben wiesen die ersten implantierten dTEHV der Tiere 51, 52, 53, 54, 55 und 56 (dTEHV A.1-6) eine sehr zarte Gewebestruktur. Hieraus resultierte eine Instabilität der Klappensegel, was zur Folge hatte, dass die Segel den Kräften, die beim Crimpingvorgang auf die Klappe einwirken, nicht standhielten und mutmaßlich Risse in den Segeln entstanden, wodurch die initiale Klappenfunktionalität deutlich beeinträchtigt wurde. Von zerrissenen Klappensegeln betroffen waren die Tiere 52, 54 und 56 (dTEHV A.2/4/6). Aus derselben Produktionsreihe stammten auch die dTEHV der Tiere 53 (dTEHV A.3) und 55 (A.5), jedoch wurden die Klappensegel hier während der Implantationsprozedur nicht beschädigt und zeigten eine gute Funktionalität. Tier 53 wurde zum Versuchsende aufgrund mangelnder Verfügbarkeit passender Räumlichkeiten erst nach 62 Wochen euthanasiert und erreichte hierbei eine RF von 30%. Tier 55 wurde 40 Wochen nach Implantation aufgrund einer RF von 44% explantiert.

Aufgrund der ersten Erfahrungen dieser Implantationen wurde das Protokoll der Klappenherstellung im Bioreaktor angepasst, sowie die Form und Struktur des verwendeten Inserts verändert (siehe 2.1). Da alle hieraufhin implantierten Klappen dem Crimpingprozess standhielten und nach Ablage die implantierten dTEHV eine gute Funktionalität zeigten, richtet sich die Auswertung des funktionellen Follow-ups (MRT, ICE, CT) nur auf die Funktionalität der dTEHV2.0 entsprechend Tabelle 1.

3.2.1 Computertomographie

Der Durchmesser aller Stents vor Implantation betrug 30 mm (siehe 2.1). Die Ergebnisse der Computertomographie zeigen, wie sich der Stent nach Ablage expandierte (Messmethode beispielhaft in Abbildung 10 dargestellt).

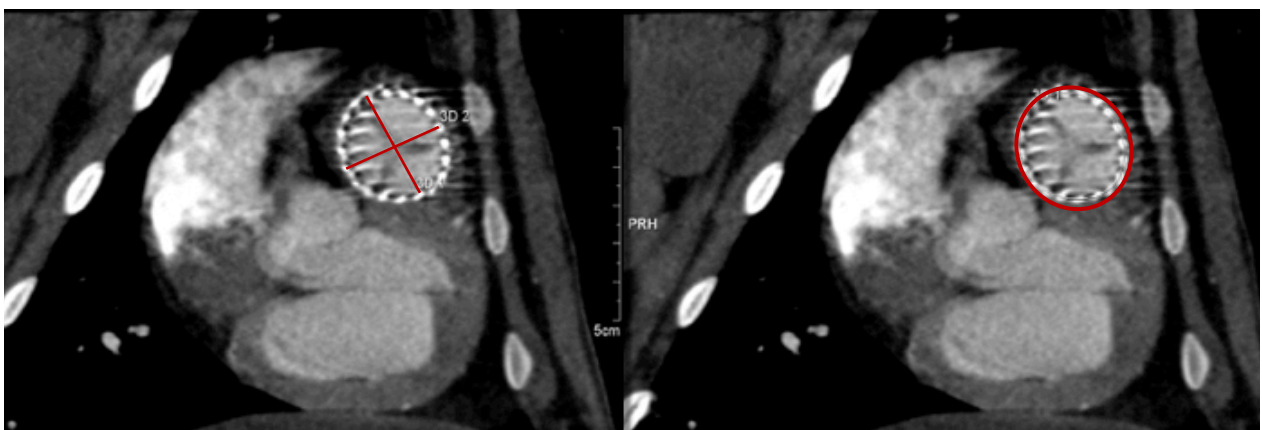


Abbildung 10: Messposition des Umfangs und der Fläche, bzw. des Stentdurchmessers in mittiger Stentposition.

Beispielhaft wird die diastolische Messung am Tier 63 im CT eine Woche nach Implantation gezeigt.

Im CT nach Implantation betrug der gemittelte Durchmesser des Stents während der Diastole an der proximalen Stentkante $28,1 \pm 1,8$ mm, mittig $27,4 \pm 1,8$ mm und an der distalen Stentkante $26,2 \pm 2,0$ mm (Tabelle 5).

Durch die hohe Radialkraft des Stents ergaben sich im CT direkt nach Implantation deutlich höhere Werte für den gemittelten diastolischen Durchmesser mittig im Stent als vor Implantation auf Höhe der Pulmonalklappe. Ein Wilcoxon-Test ergab einen signifikanten Unterschied hierfür ($p = 0,001$). Der gemittelte Durchmesser mittig im Stent blieb jedoch über den weiteren Verlauf des Follow-up stabil (Abbildung 11).

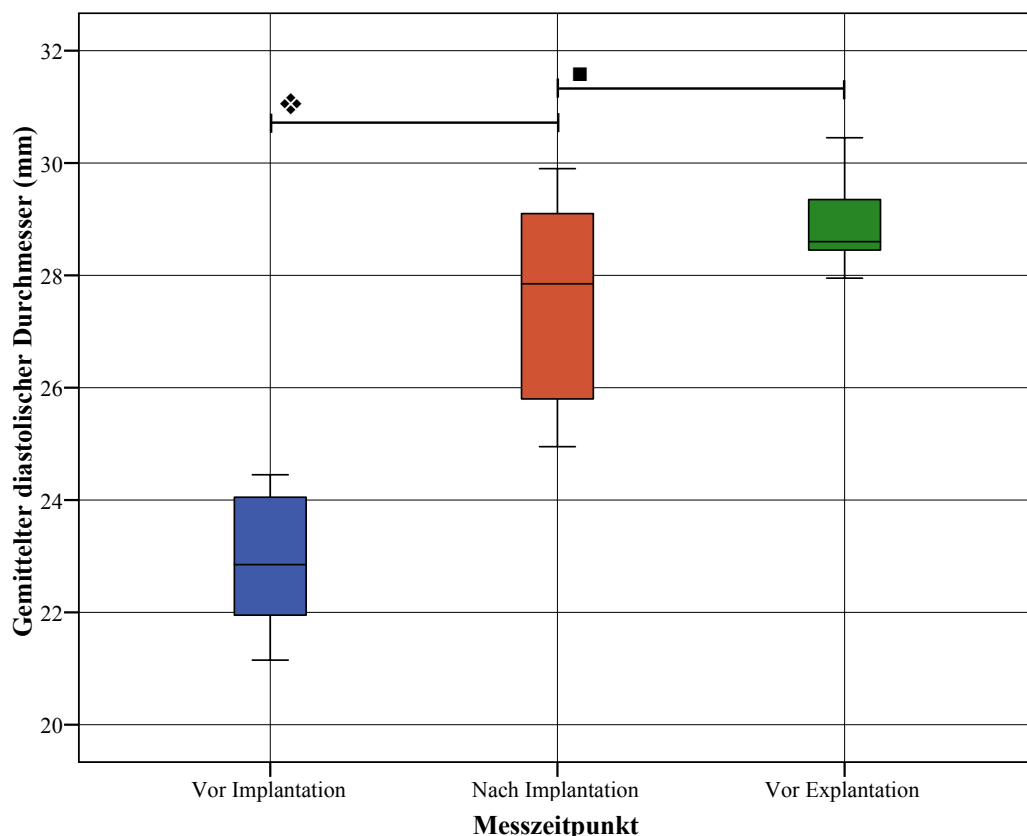


Abbildung 11: Gemittelter diastolischer Durchmesser der Pulmonalklappe.

CT1 = CT vor Implantation. CT = CT nach Implantation. CT3 = CT vor Explantation. Ergebnisse des Wilcoxon-Tests für ♦: $p = 0,005$; ■: $p = 0,015$. CT1 und CT2 $n = 10$. CT3 $n = 9$), wobei sich vor allem die Streuung der Werte verringerte zwischen CT2 und CT3 (CT2: $27,4 \pm 1,8$ mm; CT3: $28,8 \pm 1,2$ mm).

Ein Maß für die Gleichmäßige Verteilung der Radialkraft des Stents und ein geordnetes Entfalten der Klappensegel bietet die Ovalität des Stents nach Implantation. Je höher der Wert des Ovalitätsindex, desto größer ist der Unterschied zwischen maximalem und minimalem Stentdurchmesser und folglich auch die Ovalität. Der Ovalitätsindex wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Ovalitätsindex} = \frac{\text{Durchmesser}_{\text{maximal}}}{\text{Durchmesser}_{\text{minimal}}}$$

Der Ovalitätsindex betrug während der Diastole, also zum Zeitpunkt der Belastung der Klappensegel an der proximalen Stentkante $1,17 \pm 0,18$ mm, mittig im Stent $1,08 \pm 0,07$ mm und an der distalen Stentkante $1,12 \pm 0,07$ mm. In vorigen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Ovalität des Stents für die Funktionalität der Klappen des ersten Designs beschrieben [55, 57]. Diese Korrelation scheint durch die größere Koaptationsfläche der Klappensegel im neuen Design der dTEHV aufgehoben: Zwischen der Ovalität des Stents in mittlerer Position während der Diastole und der Regurgitationsfraktion im MRT besteht zum Zeitpunkt eine Woche nach Implantation keine signifikante Korrelation (Pearson Korrelationskoeffizient: $-0,508$; $p = 0,134$). Zum Zeitpunkt der Explantation besteht ebenfalls keine Korrelation zwischen der RF per MRT und dem diastolischen Ovalitätsindex mittig im Stent (Pearson-Korrelationskoeffizient: $0,473$; $p = 0,236$).

| | Stentposition | Diastole | | | Systole | | |
|----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|---------------------------|-----------------------------|----------------|---------------------------|
| | | Mittlerer Durchmesser in mm | Umfang in mm | Fläche in mm ² | Mittlerer Durchmesser in mm | Umfang in mm | Fläche in mm ² |
| Vor Implantation (n = 10) | RVOT | $26,3 \pm 2,5$ | $88,2 \pm 6,6$ | $533,3 \pm 75,0$ | $21,3 \pm 1,6$ | $69,9 \pm 4,8$ | $343,6 \pm 58,7$ |
| | Pulmonalklappe | $22,9 \pm 1,3$ | $79,0 \pm 4,8$ | $465,4 \pm 33,4$ | $22,1 \pm 1,4$ | $75,2 \pm 4,7$ | $405,9 \pm 55,5$ |
| | supravalvulär | $22,3 \pm 1,8$ | n.a. | $420,6 \pm 102,9$ | $25,6 \pm 1,7$ | $82,8 \pm 5,2$ | $527,7 \pm 64,3$ |
| Nach Implantation (n = 10) | proximal | $28,1 \pm 1,8$ | $90,4 \pm 6,7$ | $638,7 \pm 89,1$ | $27,8 \pm 1,6$ | $88,3 \pm 5,5$ | $599,8 \pm 67,4$ |
| | mittig | $27,4 \pm 1,8$ | $86,1 \pm 5,8$ | $581,8 \pm 79,5$ | $27,2 \pm 1,5$ | $87,0 \pm 5,3$ | $588,1 \pm 70,0$ |
| | distal | $26,2 \pm 2,0$ | $83,0 \pm 6,0$ | $544,8 \pm 75,2$ | $27,1 \pm 1,6$ | $86,3 \pm 4,8$ | $584,2 \pm 63,5$ |
| Vor Explantation (n = 9) | proximal | $29,0 \pm 1,0$ | $92,0 \pm 2,4$ | $661,2 \pm 33,5$ | $27,4 \pm 0,8$ | $87,5 \pm 2,5$ | $529,8 \pm 44,4$ |
| | mittig | $28,8 \pm 0,8$ | $91,2 \pm 1,9$ | $654 \pm 26,0$ | $28,4 \pm 0,8$ | $89,7 \pm 2,9$ | $624,6 \pm 37,8$ |
| | distal | $28,0 \pm 1,2$ | $89,8 \pm 2,6$ | $636,4 \pm 44,9$ | $28,3 \pm 0,9$ | $89,4 \pm 2,8$ | $627,2 \pm 38,0$ |

Tabelle 5: Übersicht über die im CT gemessenen Größenverhältnisse vor Implantation, nach Implantation und vor Explantation.

3.2.2 Druckmessungen

In den invasiven Druckmessungen konnte kein Anhalt für eine Stenose der nativen Pulmonalklappe oder der implantierten dTEHV gefunden werden. Die Ergebnisse der invasiven Druckmessungen vor und nach Implantation sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

| | | | Mittelwert | SD | Minimum | Maximum | Median |
|--|--------------------------------------|------------------|------------|------|---------|---------|--------|
| Druckmessung direkt vor Implantation in mmHg | systemischer Blutdruck | systolisch | 90,0 | 12,6 | 70,0 | 106,0 | 89,5 |
| | | diastolisch | 56,4 | 16,4 | 35,0 | 86,0 | 48,0 |
| | pulmonalarterieller Druck | systolisch | 17,5 | 4,9 | 7,0 | 24,0 | 16,5 |
| | | diastolisch | 9,4 | 4,8 | 1,0 | 19,0 | 9,0 |
| | | Mitteldruck | 13,3 | 5,0 | 3,0 | 22,0 | 13,0 |
| | rechtsventrikulärer Druck | systolisch | 23,9 | 2,8 | 20,0 | 28,0 | 23,9 |
| | | diastolisch | 2,2 | 2,3 | -2,0 | 5,0 | 2,2 |
| | | Mitteldruck | 11,1 | 3,6 | 7,0 | 19,0 | 11,1 |
| | | Δp RV-PA | 6,4 | 3,7 | 0,0 | 14,0 | 6,5 |
| Druckmessung direkt nach Implantation in mmHg | systemischer Blutdruck | systolisch | 81,8 | 11,6 | 62,0 | 98,0 | 83,5 |
| | | diastolisch | 51,7 | 11,6 | 31,0 | 65,0 | 54,5 |
| | pulmonalarterieller Druck | systolisch | 19,9 | 3,3 | 15,0 | 27,0 | 19,0 |
| | | diastolisch | 8,9 | 3,9 | 4,0 | 16,0 | 7,5 |
| | | Mitteldruck | 14,1 | 3,4 | 10,0 | 21,0 | 13,5 |
| | rechtsventrikulärer Druck | systolisch | 24,4 | 3,5 | 18,0 | 30,0 | 25,0 |
| | | diastolisch | 4,4 | 2,0 | 1,0 | 9,0 | 4,0 |
| | | Mitteldruck | 12,2 | 2,9 | 8,0 | 18,0 | 12,0 |
| | | Δp RV-PA | 4,5 | 2,7 | -1,0 | 8,0 | 5,0 |
| Druckmessung direkt vor Explantation in mmHg | systemischer Blutdruck | systolisch | 88,8 | 10,0 | 75,0 | 107,0 | 89,0 |
| | | diastolisch | 57,5 | 10,1 | 44,0 | 77,0 | 59,5 |
| | pulmonalarterieller Druck | systolisch | 20,9 | 4,0 | 14,0 | 28,0 | 22,5 |
| | | diastolisch | 8,3 | 3,5 | 3,0 | 17,0 | 8,0 |
| | | Mitteldruck | 13,5 | 3,4 | 8,0 | 21,0 | 14,0 |
| | rechtsventrikulärer Druck | systolisch | 25,2 | 3,2 | 19,0 | 31,0 | 25,0 |
| | | diastolisch | 1,7 | 2,8 | -3,0 | 6,0 | 1,5 |
| | | Mitteldruck | 11,2 | 3,5 | 6,0 | 18,0 | 11,0 |
| | | Δp RV-PA | 4,3 | 4,9 | -4,0 | 13,0 | 4,0 |

Tabelle 6: Druckmessungen der dTEHV im Herzkatheter direkt vor und direkt nach Implantation, sowie direkt vor Explantation.

n = 10.

Vor allem aus den Messungen der Druckdifferenzen zwischen rechtem Ventrikel und der Pulmonalarterie lässt sich ein gutes Öffnungsverhalten der Klappe ableiten. Weder vor noch nach Implantation sind erhöhte Werte des pulmonalarteriellen oder systemischen Blutdrucks erfasst worden.

Direkt vor Explantation wurden erneut Druckmessungen durchgeführt. Abbildung 12 gibt einen Überblick über den Verlauf der Druckdifferenz zwischen RV und PA. Es ist zu erkennen, dass die Verteilung der Werte zu allen drei Messzeitpunkten ähnlich ist.

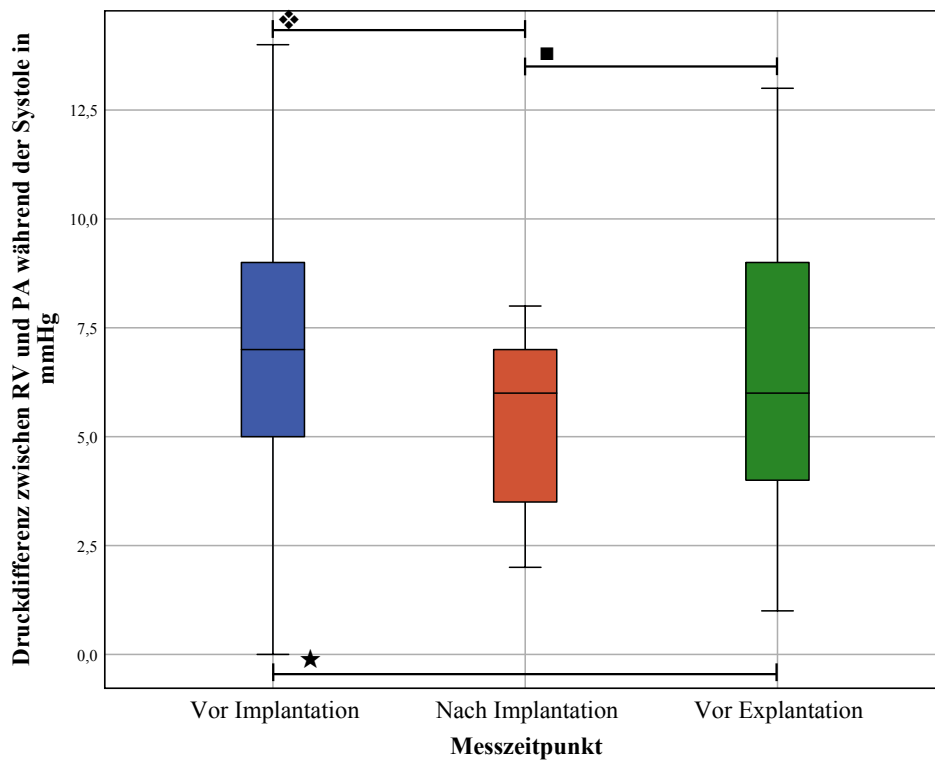


Abbildung 12: Box-Whisker-Plot über den Verlauf der Druckdifferenz zwischen rechtem Ventrikel und Pulmonalklappe während der Systole.

PG1 = Druckmessung direkt vor Implantation. PG2=Druckmessung direkt nach Implantation. PG3 = Druckmessung direkt vor Explantation Ergebnisse des Wilcoxon-Tests: ❖: $p = 0,106$; ■: $p = 1,000$; ★: $p = 0,240$. $n = 10$ für alle Messungen.

Im Wilcoxon-Test bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten des Druckgradienten.

3.2.3 MRT

Zusätzlich zu den ICE-Untersuchungen wurden MRT-Aufnahmen angefertigt um Flussvolumina des ante- und retrograden Flusses durch die Pulmonalklappe zu quantifizieren, sowie volumetrische Messungen des rechten Ventrikels vorzunehmen. Die MRT-Untersuchungen fanden zu den in 2.9 beschriebenen Zeitpunkten alle 4 Wochen statt. Konnte eine Untersuchung des Follow-Up nicht stattfinden, so wurde das zu untersuchende Tier zum darauffolgenden Follow-Up-Termin untersucht. Jedes Schaf bekam so im Schnitt alle $37,6 \pm 19,13$ Tage eine MRT-Untersuchung.

3.2.3.1 Flussmessungen

Die Auswertung der Phasenkontrastsequenzen ergibt eine quantitative Messung des antegraden und retrograden Flusses durch die Pulmonalklappe, welcher hier als Flussprofil dargestellt ist (Abbildung 13).

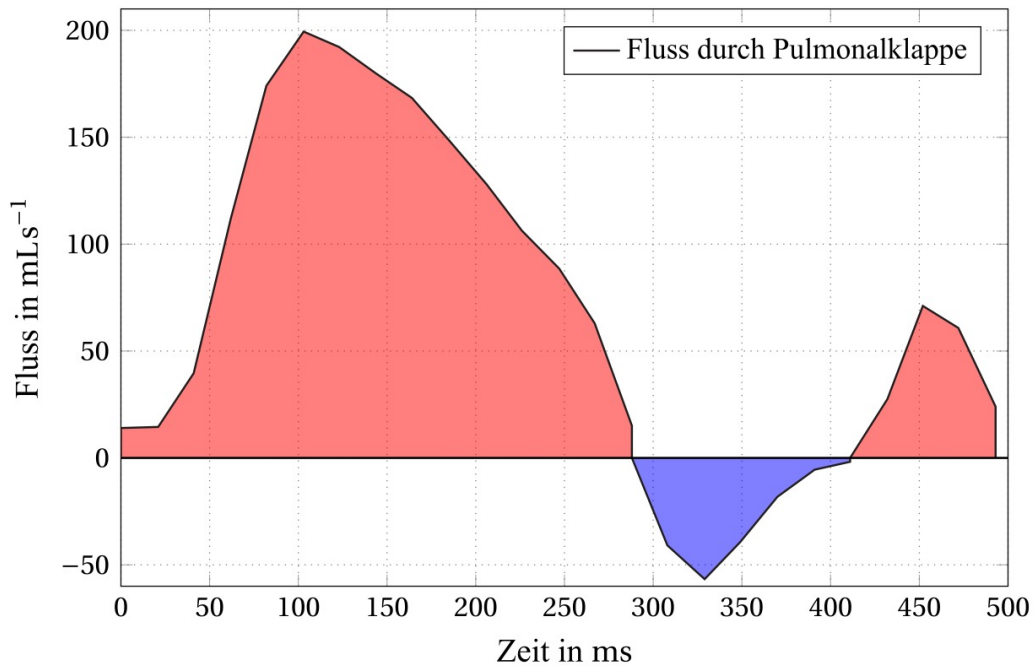


Abbildung 13: Profil des quantifizierten Flusses durch die Pulmonalklappe im MRT.

Hier beispielhaft am Tier 65 zum Messzeitpunkt Woche 44 dargestellt. Rot = antrader Fluss. Blau = retrograder Fluss.

Aus dem Integral dieses Flussprofils ergibt sich die Regurgitationsfraktion. In der farbkodierten Darstellung der Flussesequenzen konnten vor allem zentrale Insuffizienzen der dTEHV beobachtet werden (Abbildung 14). Dieser Befund wird durch die Ergebnisse der intrakardialen Echokardiographie gestützt, da hierbei ebenfalls vor allem zentrale Insuffizienzjets zu verzeichnen waren (siehe 3.2.4).

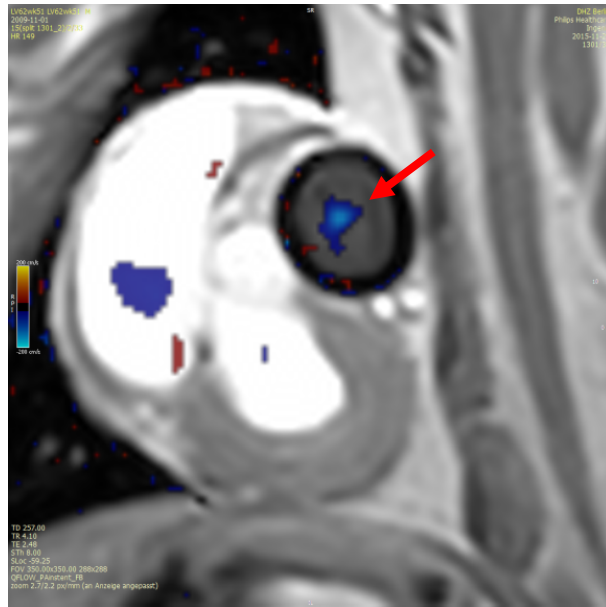


Abbildung 14: Transversalschnitt des Stents auf Höhe der dTEHV aufgenommen im MRT während der Diastole.

Rot = antegrader Fluss. Blau = retrograder Fluss. Die mit der roten Pfeilspitze gekennzeichnete blaue Fläche markiert eine zentrale Regurgitation der dTEHV.

Die Werte der Flussmessungen durch die Pulmonalklappe sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

dTEHV B.1 (Schaf 57) zeigte bei der 20-Wochen Follow-Up Untersuchung eine Regurgitationsfraktion von >30% und erfüllte somit das Abbruchkriterium. Zum Zeitpunkt des 24-Wochen Follow-Up Termin wurde die Klappe dieses Tiers explantiert. Bei den Tieren 57 und 58 (dTEHV B.1/B.2) wurde vor der Implantation keine Flussmessung der nativen Klappe durchgeführt, alle anderen Schafe zeigten keine bzw. minimalste (Schaf 100: 1% RF) Regurgitationen durch die native Pulmonalklappe. Im Median stellte sich ein sukzessiver Anstieg der Regurgitation bis Woche 36 (von 9% in Woche 1 bis 13,5% in Woche 36) dar. Danach fiel sie ab auf 7,5% in Woche 40 und erreicht bis zum Versuchsende bei Woche 52 wieder einen Wert von 14,2%. Abbildung 15 zeigt eine graphische Darstellung der Regurgitationsmessungen über die gesamte Zeit des Follow-ups.

| Zeit | nativ | W1 | W4 | W8 | W12 | W16 | W20 | W24 | W28 | W32 | W36 | W40 | W44 | W48 | W52 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| n | 8 | 10 | 5 | 7 | 8 | 7 | 4 | 9 | 8 | 6 | 6 | 8 | 8 | 8 | 9 |
| RF in | 0,0 | 9,0 | 9,0 | 12,0 | 9,2 | 12,0 | 9,5 | 10,0 | 11,3 | 12,4 | 13,5 | 7,5 | 9,0 | 8,7 | 14,2 |
| % | (0,0) | (5,3) | (3,0) | (6,5) | (2,9) | (5,1) | (9,8) | (6,5) | (6,5) | (4,7) | (9,1) | (1,9) | (7,9) | (7,6) | (9,5) |

Tabelle 7: Messwerte der Regurgitationsfraktion (RF) über der Pulmonalklappe.

Die Werte der RF sind als Median (Interquartilsabstand angegeben).

Zum Zeitpunkt der Explantation bei 52 Wochen lag die mediane RF bei 14,2 %, was gleichzeitig den höchsten medianen Wert über den gesamten Messverlauf darstellte. Den höchsten Wert bei diesem Messzeitpunkt zeigte dTEHV E.4 mit 25,7% RF, den niedrigsten Wert zum Explantationszeitpunkt hatte die Klappe B.2 mit 7,7 % (Abbildung 15). Zu diesem Zeitpunkt sind grundsätzlich drei verschiedene Gruppen bezüglich des funktionellen Outcomes zu unterscheiden: vier dTEHV lagen unterhalb des Medians, zwei etwa auf dem Median und drei Tiere deutlich darüber. Diese Ergebnisse suggerieren, dass innerhalb der implantierten Klappen Remodeling-Prozesse ablaufen, welche in unterschiedliche Richtungen verlaufen. Potenzielle Gründe für dieses unterschiedlich ablaufende Remodeling werden zu einem späteren Zeitpunkt in der Diskussion weiter erörtert (siehe 4.5).

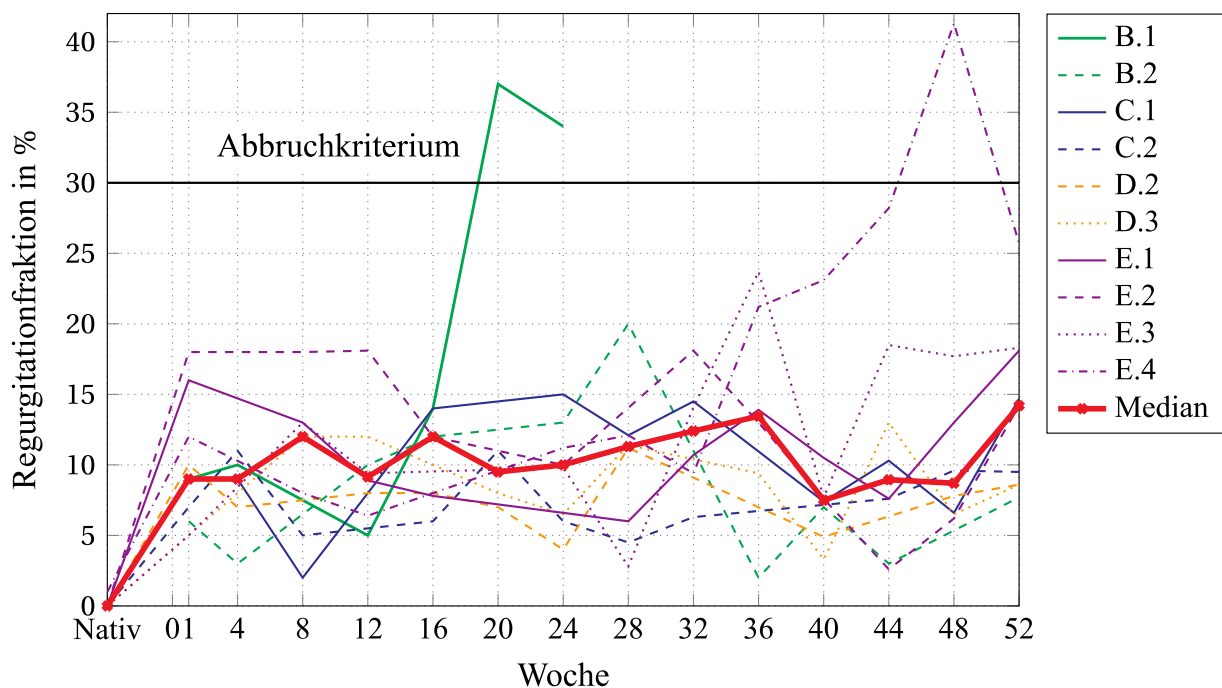


Abbildung 15: Verlauf der Regurgitationsfraktion über die Messzeitpunkte des Follow-Up.

Die Gruppenzuteilung B, C, D und E steht für die jeweiligen Produktionsreihen der dTEHV.

Auffällig ist, dass einige Tiere einen sehr stabilen, andere einen eher instabilen Verlauf der Regurgitationsfraktion zeigen. Errechnet man die Mittelabweichung, also die durchschnittliche Abweichung der Datenpunkte zum eigenen Mittelwert, so erhält man ein gutes Maß für die Streuung der Werte eines Tieres. Folgende Formel wurde zur Berechnung herangezogen:

$$\text{Mittelabweichung} = \frac{1}{n} \sum |x - \bar{x}|$$

Hieraus lässt sich eine gewisse Stabilität bzw. Instabilität im Verlauf ableiten. Den stabilsten Verlauf (ausgenommen Klappe B1 bzw. Schaf 57, da hier kein Follow-up über 52 Wochen erreicht werden konnte) zeigte nach dem beschriebenen Schema Klappe D.2 (Schaf 64) mit einer Mittelabweichung von 1,54. Am instabilsten erwies sich Klappe E.4 mit einer Mittelabweichung von 8,95 (Tabelle 8).

| dTEHV | B.1 | B.2 | C.1 | C.2 | D.2 | D.3 | E.1 | E.2 | E.3 | E.4 |
|-------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Mittelabweichung | 11,56 | 4,30 | 3,31 | 1,95 | 1,54 | 2,60 | 3,08 | 4,41 | 5,18 | 8,95 |

Tabelle 8: Mittelabweichungen der einzelnen dTEHV.

3.2.3.2 Volumetrie

Um die hämodynamischen Auswirkungen etwaiger Insuffizienzen auf die kardiale Leistung und Belastung untersuchen zu können wurden volumetrische Messungen des rechten Ventrikels (RV) vorgenommen. Ausgewertet wurden hierbei vor allem das enddiastolische Volumen (EDV) und die rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion (RVEF) als Parameter für eine Dilatation des rechten Ventrikels oder einer verminderten Funktionsfähigkeit.

Das EDV stieg im Mittel von $57,2 \pm 11,5$ ml (Woche 1) auf $80,3 \pm 17,8$ ml (Woche 52). Kongruent dazu verhält sich der Median (53,0 ml nativ zu 87,0 ml bei Woche 52).

Ähnlich verhält es sich bezüglich der RVEF. Hier steigt die Ejektionsfraktion von $59,3 \pm 8,6$ ml im Mittel (Woche 1) auf $68,4 \pm 3,6$ ml im Mittel (Woche 52) im Follow-Up. Die Entwicklung dieser beiden Parameter lässt darauf schließen, dass in der Zeit der Nachbeobachtung eine Vergrößerung des rechten Ventrikels stattgefunden hat. Als Erklärung hierfür lässt sich jedoch nicht zuerst eine chronische Volumenbelastung des Ventrikels aufgrund einer insuffizienten Pulmonalklappe finden, sondern vielmehr besteht ein Zusammenhang zum steigenden Körpergewicht der Schafe. Dieses betrug zum Zeitpunkt der Implantation $42,6 \pm 5,5$ kg, zum Zeitpunkt der Explantation $52,0 \pm 2,1$ kg.

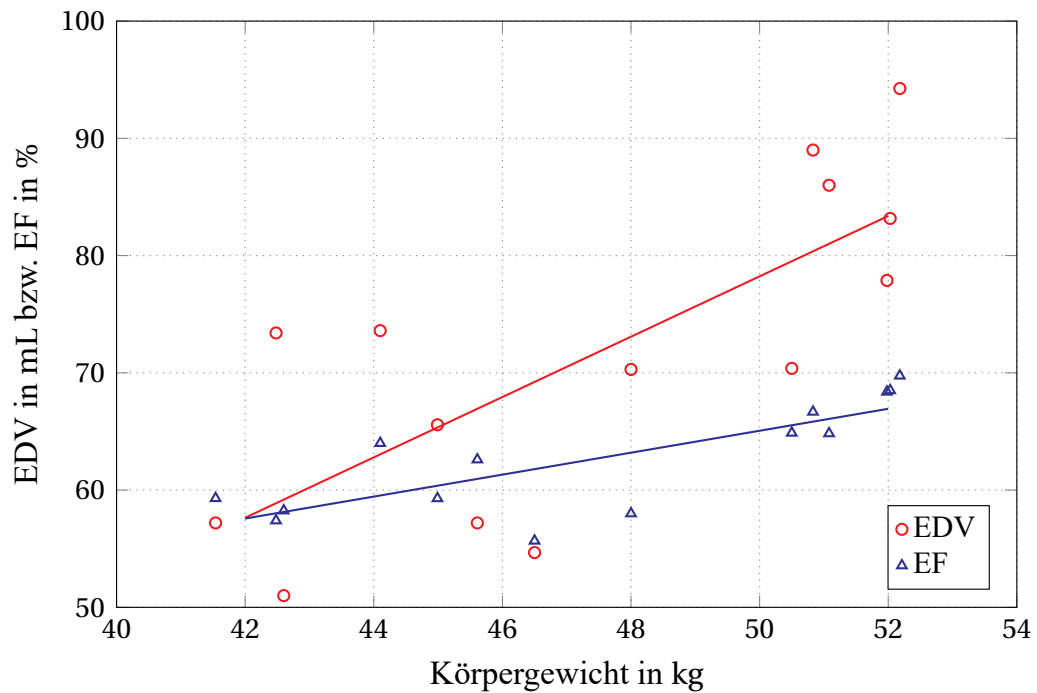


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Körpergewicht und dem enddiastolischen Volumen (EDV) bzw. der Ejektionsfraktion (EF) des rechten Ventrikels der Schafe.

Verglichen wurden die Mittelwerte aller Klappen zu den einzelnen Zeitpunkten im Follow-up. Beispielsweise bezeichnet ein Datenpunkt den Mittelwert aller Tiere zum Messzeitpunkt 4 Wochen nach Implantation: zu diesem Zeitpunkt betrug das mittlere Körpergewicht aller Tiere 41,54 kg, das EDV (roter Kreis) beträgt 57,2ml, die EF (blaues Dreieck) 59%.

Die Pearson-Korrelation zwischen den Werten des EDV und des Körpergewichts beträgt 0,902 ($p < 0,05$) zwischen Werten der EF und des Körpergewichts beträgt sie 0,845 ($p < 0,05$). Grundlage für die Korrelation boten die Mittelwerte der einzelnen Messzeitpunkte. Die Zunahme des EDV und der EF lässt sich folglich zumindest teilweise durch die Korrelation zum ebenfalls steigenden Körpergewicht der Schafe begründen. Abbildung 16 zeigt den linearen Zusammenhang zwischen den genannten Größen.

Zwischen den Werten der Regurgitationsfraktion und rechtsventrikulären EDV bzw. der rechtsventrikulären EF besteht keine signifikante Korrelation (Tabelle 9).

| Pearson Korrelation | Körpergewicht | RF | RV-EDV | RV-EF |
|----------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Körpergewicht | 1 | 0,35 (p = 0,22) | 0,902* (p < 0,05) | 0,845* (p < 0,05) |
| RF | 0,350 (p = 0,22) | 1 | 0,163 (p = 0,58) | -0,006 (p = 0,98) |
| RV-EDV | 0,902* (p < 0,05) | 0,163 (p = 0,58) | 1 | 0,765* (p < 0,05) |
| RV-EF | 0,845* (p < 0,05) | -0,006 (p = 0,98) | 0,765* (p < 0,05) | 1 |

Tabelle 9: Pearson Korrelation zwischen Körpergewicht, Regurgitationsfraktion, RV-EDV und RV-EF.

Signifikante Korrelationen sind mit * markiert.

3.2.4 Intrakardialer Ultraschall

Im Rahmen des Follow-Up wurde in vierwöchigen Abständen eine intrakardiale Echokardiographie (ICE) angesetzt (siehe 2.9). Nicht immer konnte für jedes Schaf jede Follow-up-Untersuchung durchgeführt werden. Verpasste ein Schaf eine der angesetzten Untersuchungen, so wurde es, kongruent zu den MRT-Untersuchungen erst wieder zum nächsten Follow-up-Termin untersucht. Eine intrakardiale Echokardiographie wurde infolge dessen im Mittel alle $43,8 \pm 12,6$ Tage durchgeführt.

3.2.4.1 PISA

Um die Klappenfunktion über die von der European Society of Cardiology vorgeschlagenen Empfehlungen [60] hinaus tiefergehend beurteilen zu können, wurde die proximal isovelocity surface area (PISA) als weiterer Parameter im ICE herangezogen. Abbildung 17 zeigt exemplarisch die Messung des PISA Radius. Die Aliasing-Geschwindigkeit (Nyquist-Grenze), welche bei der Berechnung der effektiven Öffnungsfläche der Insuffizienz zum Tragen kommt, ist farblich kodiert.

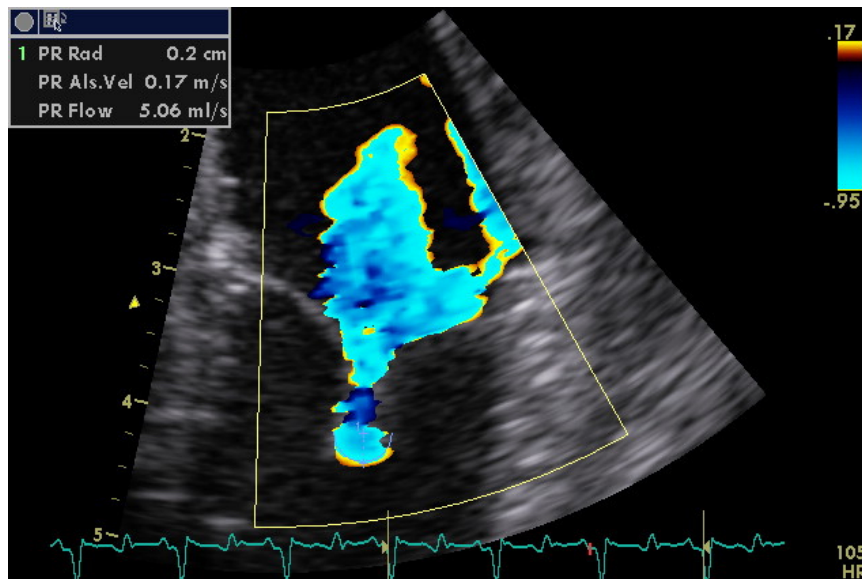


Abbildung 17: PISA-Messung bei Schaf 75 (dTEHV E.2) Woche 12.

Der PISA-Radius beträgt hier 2 mm, bei einer Aliasing Velocity von 0,17 m/s.

Resultierend aus dem Radius der PISA und den CW-Doppler Messungen im Regurgitationsjet konnte die effektive Öffnungsfläche (effective region of orifice, ERO) berechnet werden, durch die der Strom der Regurgitation als retrograder Blutfluss zieht. Folgende Formel wurde hierzu verwendet [66]:

$$ERO = \frac{Nyquistgrenze_{PISA} \times 2\pi r_{PISA}^2}{V_{max\ Insuffizienzjet}}$$

Die Ergebnisse der PISA und der daraus errechneten effektiven Öffnungsfläche der Regurgitation sind in Tabelle 10 wiedergegeben.

Die errechnete effektive Öffnungsfläche korreliert mit der im MRT bestimmten Regurgitationsfraktion (Pearson-Korrelationskoeffizient = 0,68, p = 0,008).

3.2.4.2 Vena Contracta

Ebenso wie die PISA wurde die Vena Contracta (VC) als zusätzlicher Parameter zur besseren Beurteilbarkeit der Klappe aufgezeichnet und vermessen. Abbildung 18 zeigt exemplarisch die Messung der VC im Bezug zum Gesamtdurchmesser der dTEHV.

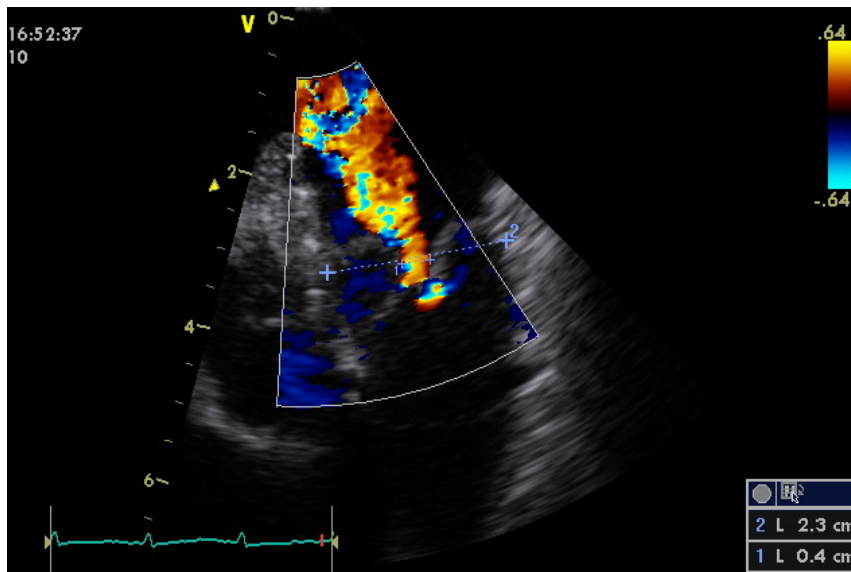


Abbildung 18: VC-Messung bei Schaf 62 (dTEHV E.3), Woche 12.

Die Vena Contracta beträgt hier 17 % ($\frac{0,4}{2,3} \text{ cm}$).

Die Ergebnisse der VC-Messungen sind in Tabelle 10 wiedergegeben. Es ist zu erkennen, dass die Werte der Vena Contracta sowohl im Median als auch im Mittelwert bis zum Messzeitpunkt der Wochen 36/40/44 ansteigen, danach jedoch geringfügig abfallen. Die VC beträgt zum Explantationszeitpunkt 52 Wochen nach Implantation der dTEHV im Median 8,7%, was auf eine gute Klappenfunktion hinweist.

Zwischen den Werten der PISA und VC besteht eine hohe Korrelation (Pearson-Korrelationskoeffizient = 0,79, $p = 0,001$). Die beiden in der intrakardialen Echokardiographie erhobenen Parameter haben also eine hohe Kongruenz zueinander.

Abbildung 19 zeigt den Verlauf der PISA, ERO und VC über den gesamten Zeitraum des Follow-ups, die zugehörigen Daten werden in Tabelle 10 angegeben.

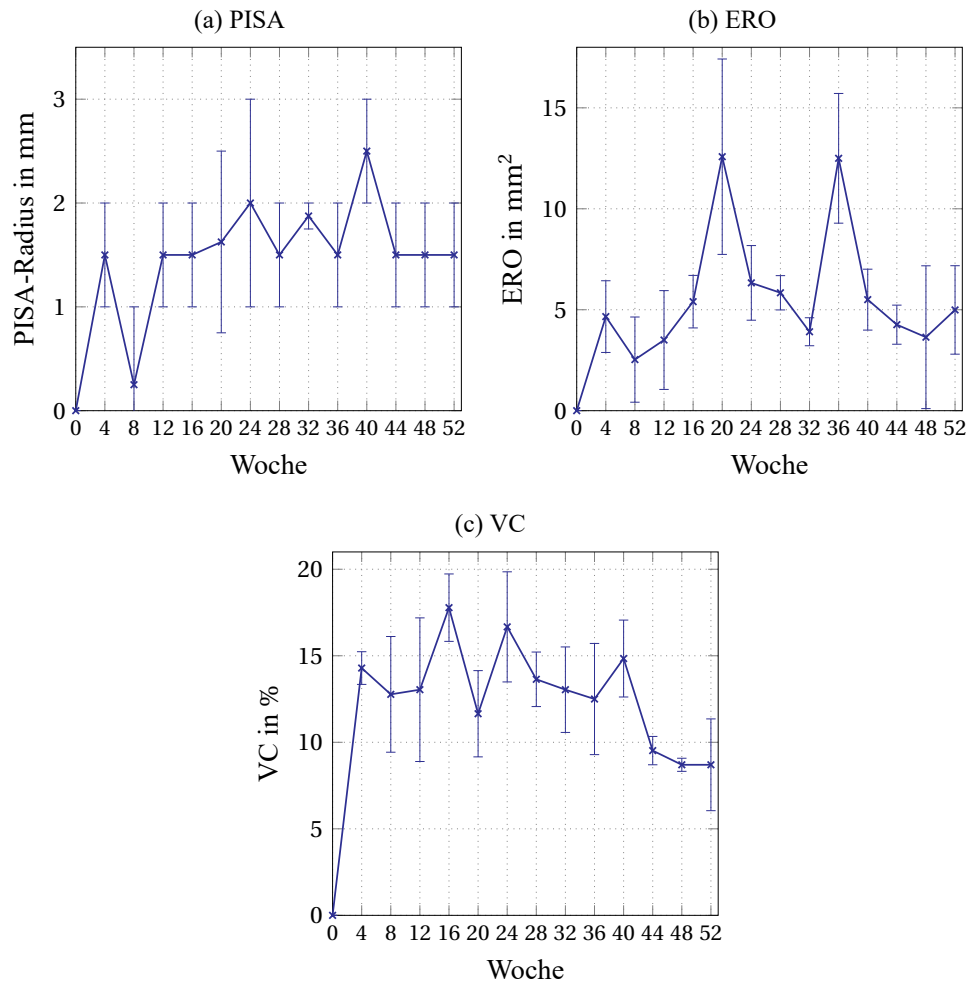


Abbildung 19: Verlauf von PISA, ERO und VC über den gesamten Follow-up-Zeitraum dargestellt durch Median und Interquartilsabstände.

| Woche | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 | 40 | 44 | 48 | 52 |
|--------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| n | 10 | 3 | 6 | 6 | 4 | 4 | 4 | 7 | 4 | 5 | 8 | 9 | 7 | 9 |
| PISA-Radius in mm | 0 (0) | 2 (1) | 1 (1,5) | 2 (1) | 2,5 (1,8) | 3 (2) | 2 (1) | 2 (0,3) | 2 (0,3) | 2 (1) | 3 (1) | 2 (1) | 2 (1) | 2 (1) |
| ERO in mm² | 0,0 (0,0) | 4,7 (3,6) | 2,5 (4,2) | 7,1 (6,3) | 5,4 (2,6) | 12,6 (9,7) | 6,3 (3,7) | 5,8 (1,7) | 3,9 (1,4) | 12,5 (6,4) | 5,5 (3,0) | 4,3 (1,9) | 3,6 (7,1) | 5,0 (4,4) |
| VC in % | 0,0 (0,0) | 14,3 (1,9) | 12,8 (6,7) | 13,0 (8,3) | 17,8 (3,9) | 11,7 (5,0) | 16,7 (6,4) | 13,6 (3,2) | 13,0 (4,9) | 12,5 (6,4) | 14,8 (4,4) | 9,5 (1,6) | 8,7 (0,8) | 8,7 (5,3) |

Tabelle 10: Messwerte des PISA-Radius, der ERO und VC.

Angegeben sind Median (Interquartilsabstand).

3.2.4.3 Flussgeschwindigkeit

In der intrakardialen Echokardiographie wurden über den continuous wave (CW) Doppler antegrade Flussprofile aufgezeichnet. Hieraus ergaben sich maximale Flussgeschwindigkeiten während der Systole. Diese Werte können einen Anhalt geben über Stenosen im rechtsventrikulären Ausflusstrakt (RVOT) oder dem Bereich der dTEHV geben. In der Literatur sind die Grenzwerte für eine leichtgradige Stenose der Pulmonalklappe auf 3 m/s angesetzt [61]. Alle dTEHV befanden sich zu jedem Messzeitpunkt während des Follow-ups unterhalb dieser Schwelle. Maximale Werte von 1,59 m/s wurden von dTEHV E.1 (Schaf 73) zum Messzeitpunkt 12 Wochen nach Implantation erreicht. Tabelle 11 gibt die gemessenen Werte der maximalen Flussgeschwindigkeit im Vorwärtsfluss wieder.

| Zeit | nativ | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 | 40 | 44 | 48 | 52 |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| n | 10 | 10 | 3 | 6 | 7 | 5 | 4 | 5 | 7 | 5 | 6 | 8 | 9 | 7 | 9 |
| PvVmax in m/s | 1,4 (0,6) | 0,8 (0,3) | 1,1 (0,1) | 1,0 (0,9) | 1,7 (0,3) | 1,3 (0,1) | 1,1 (0,5) | 1,0 (0,3) | 1,8 (0,1) | 2,0 (0,3) | 2,9 (0,3) | 2,0 (0,1) | 1,4 (0,2) | 1,2 (0,2) | 1,4 (0,4) |

Tabelle 11: Maximale Flussgeschwindigkeiten des antegraden Flusses (PvVmax) durch die Pulmonalklappe während der Systole.

Die Spalte „nativ“ gibt den PvVmax der nativen Pulmonalklappe im ICE direkt vor Implantation der dTEHV an.

3.2.4.4 Insuffizienzgrade

Zusätzlich zu den Aufzeichnung der PISA und VC wurden die Insuffizienzgrade der Klappen gemäß den Richtlinien der European Society of Cardiology (ESC) graduiert [60]. Konnte eine Klappe nicht eindeutig einem der ESC vorgegebenen Insuffizienzgraden zugeteilt werden, wurde die Insuffizienz in der Mitte der zwei Werte angesiedelt (z.B. Insuffizienzgrad 0,5 oder 1,5).

Einen Überblick über den Verlauf der Insuffizienzgrade gibt Tabelle 12. Selbst 52 Wochen nach Implantation lag bei keinem der im Versuch verbliebenen Tiere eine schwere Insuffizienz vor und nur zwei moderate Insuffizienzen. Die einzige schwere Insuffizienz im Verlauf des Follow-ups geht auf die Klappe B.1 (Schaf 57) zurück, welches nach 24 Wochen explantiert werden musste. Teilweise verbesserte sich die Klappenfunktion echokardiographisch sogar: Insuffizienzgrad der Klappe E.2 (Schaf 75) von 1,5 (Woche 48) auf 1 (Woche 52) hin. Klappe B.2 (Schaf 58) von 2 (Woche 44) auf 1 (Woche 52). Ähnlich verhielten sich die Klappen C.2 (Schaf 63) und D.3 (Schaf 65): Insuffizienzgrad der Klappe C.2 von 1 (Woche 32) auf 0 (Woche 44 bis Woche 52) und Insuffizienzgrad der Klappe D.3 von 1,5 (Woche 36) auf 1 (Woche 40 bis Woche 52).

| Woche Klappe | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 | 40 | 44 | 48 | 52 |
|-----------------|---|---|-----|----|----|----|----|-------------|-----|-----|----|----|-----|----|
| B.1 | 0 | | | 2 | 2 | | 3 | explantiert | | | | | | |
| B.2 | 1 | | | 0 | 2 | | | 1 | | 2 | 2 | 2 | | 1 |
| C.1 | 0 | 1 | 1 | | | | 1 | 2 | 1 | | 1 | 1 | | 1 |
| C.2 | 1 | 1 | 0 | | | 0 | 1 | 1 | 1 | | | 0 | 0 | 0 |
| D.2 | 0 | 1 | | | 2 | 1 | 2 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D.3 | 0 | | | 1 | | 1 | 2 | 1,5 | | 1,5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| E.1 | 0 | | 0 | 1 | 2 | | | 1 | | 0,5 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| E.2 | 0 | | 0,5 | 0 | 1 | | | 1 | 1 | 0,5 | 1 | 0 | 1,5 | 1 |
| E.3 | 0 | | 0 | 1 | | | | | 1 | 0,5 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| E.4 | 0 | | 0 | 2 | | | | | 1,5 | 1 | 2 | 1 | 1,5 | 2 |

Tabelle 12: Pulmonaler Insuffizienzgrad via ICE im Verlauf des gesamten Follow-ups.

Legende: grün/0 - keine Insuffizienz; gelb/1 – milde Insuffizienz; ocker/1,5 – Insuffizienzgrad zwischen mild und moderat; orange/2 – moderate Insuffizienz; rot/3 – schwere Insuffizienz

3.2.4.5 Koaptation

Die Koaptationszone entspricht der Fläche, an der die Klappensegel an ihrem oberen Rand im Bereich der Lunula in der Diastole aneinander liegen und somit einen suffizienten Schluss der Klappe bilden (Abbildung 20). Daher kommt der Länge dieser Koaptation bei der Beurteilung von Klappeninsuffizienzen eine besondere Bedeutung zu.

Im Verlauf des Follow-ups veränderte sich die Koaptationslänge der dTEHV. Aufgrund der im Labor entwickelten Geometrie war die Koaptation bei allen Klappen im initialen ICE sehr hoch, verringerte sich jedoch kontinuierlich in den ersten Wochen des Follow-ups. Bis Woche 24 ging die Koaptationslänge noch zurück, blieb dann aber bis zum Ende der Nachbeobachtungszeit stabil. Ein Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben ergab für die Werte zwischen Woche 0 und Woche 24 einen signifikanten Unterschied ($p = 0,039$). Zwischen Woche 24 und Woche 52 besteht kein signifikanter Unterschied der Koaptationslänge ($p = 1,000$) (Tabelle 13). Eine Koaptation der Klappensegel konnte zu jedem Messzeitpunkt bei jeder Klappe beobachtet werden, es war zudem kein Prolaps eines Segels in den RVOT vorhanden.

Die Messungen der Koaptationslängen im ICE sind jedoch kritisch zu betrachten. Für eine optimale Betrachtung muss die dargestellte Bildebene im Echo direkt parallel zu den Seitenkanten des Stents stehen. Durch eine schräge Darstellung der Klappe in der Echokardiographie können die Werte möglicherweise überschätzt werden.

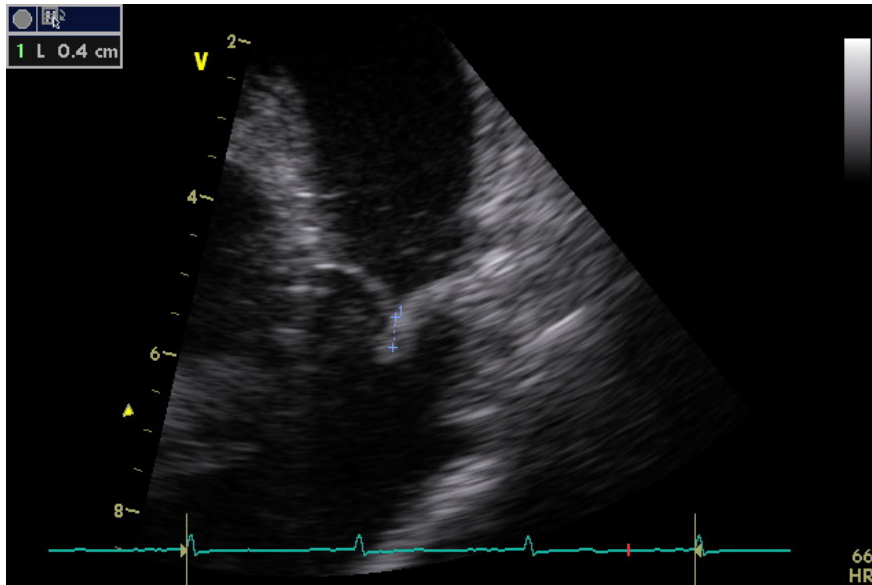


Abbildung 20: Koaptation der Klappensegel der dTEHV.

Die Koaptationszone ist rot eingekreist. Exemplarisch dargestellt ist die Klappe D.2 (Schaf 64) zum Zeitpunkt der Explantation. Die Koaptationslänge betrug hierbei 4 mm.

| Woche | n | Koaptationslänge in mm | Wilcoxon-Test |
|-------|----|------------------------|---------------|
| 0 | 11 | 7,2 ± 2,8 | p=0,039 |
| 24 | 5 | 3 ± 1,6 | |
| 52 | 9 | 2,8 ± 1,2 | p=1,000 |

Tabelle 13: Übersicht über die Koaptationslängen der Klappensegel.

3.3 Explantation

Kriterien für die Explantation waren eine Regurgitationsfraktion > 30% im MRT und/oder eine offensichtliche klinische Beeinträchtigung des Wohls der Schafe nach den Score-Kriterien des Tierversuchsantrages. Spätestens nach 52 Wochen Nachbeobachtungszeit wurden jedoch alle Schafe euthanasiert und die dTEHV explantiert. Nach anfänglichen Problemen mit der Zuverlässigkeit der Klappen, konnten im Verlauf der Studie durch eine Anpassung des Bioreaktors 9 von 10 Tieren eine Nachbeobachtungszeit von 52 Wochen erreichen. Gründe für die Explantation und deren Zeitpunkt sind in Tabelle 14 angegeben.

| Schaf- Nummer | Produktionsreihe | Explantationszeitpunkt (Wochen nach Implantation) | Grund |
|---------------|------------------|--|--------------------------|
| 51 | A.1 | 1 | Blutung |
| 52 | A.2 | 9 | Abbruchkriterium: RF>30% |
| 53 | A.3 | 62 | Abbruchkriterium: RF>30% |
| 54 | A.4 | 8 | Abbruchkriterium: RF>30% |
| 55 | A.5 | 40 | Abbruchkriterium: RF>30% |
| 56 | A.6 | 8 | Abbruchkriterium: RF>30% |
| 57 | B.1 | 24 | Abbruchkriterium: RF>30% |
| 58 | B.2 | 52 | ✓ |
| 61 | C.1 | 52 | ✓ |
| 63 | C.2 | 52 | ✓ |
| 60 | D.1 | 52 | ✓, Doppelklappe |
| 64 | D.2 | 52 | ✓ |
| 65 | D.3 | 52 | ✓ |
| 73 | E.1 | 52 | ✓ |
| 75 | E.2 | 52 | ✓ |
| 62 | E.3 | 52 | ✓ |
| 100 | E.4 | 52 | ✓ |

Tabelle 14: Übersicht über die Explantationszeitpunkte und –gründe.

Tier 53 wurde aufgrund von mangelnder Verfügbarkeit passender Räumlichkeiten zur Explantation erst nach 62 Wochen explantiert. Alle mit ✓ versehenen Tiere wurden regulär zum Versuchsende nach 52 Wochen mit einer RF < 30 % explantiert.

3.4 Makroskopie

Die Klappen zeigten bei der Explantation makroskopisch ein homogenes, weißlich glänzendes Gewebe mit feiner, jedoch stabiler Segelstruktur. Alle Segel wiesen zum Zeitpunkt der Explantation nach wie vor eine bauchige Form auf. Die in der ersten Produktionsgruppe (A.1 – A.6) festgestellten Löcher in den Klappensegeln stellten sich während der Explantation in den entsprechenden Klappen dar (Tabelle 16).

Die Klappe von Schaf 52 (dTEHV A.2) offenbarte im aortalen Segel eine reduzierte Segelfläche. Dies ist wohl auf die Verletzung des Segels während des Rückzugs der Katheterspitze bei der Implantation der Klappe zurück zu führen. Noch nicht resorbierte Scaffoldreste waren als bräunlich-rötliche matte Strukturen im Bereich des Klappengewebes im Segelbauch erkennbar.

In der makroskopischen Begutachtung der anderen explantierten Klappenstents präsentierten sich zarte, weißlich glänzende Klappensegel, welche flexibel und gut beweglich waren. Die einzelnen Segel waren stark bauchig geformt. Es waren keine Scaffoldreste, Thromben oder andere Auflagerungen zu erkennen (Abbildung 21).

Lediglich die Klappe des Tier 73 (dTEHV E.1) präsentierte sich mit einer Vegetation auf der ventrikulären Seite eines Segels, welche histologisch als septische Absiedelung gewertet wurde (siehe 3.4)

Makroskopisch waren in keiner der Klappen Kalzifizierungen zu erkennen.

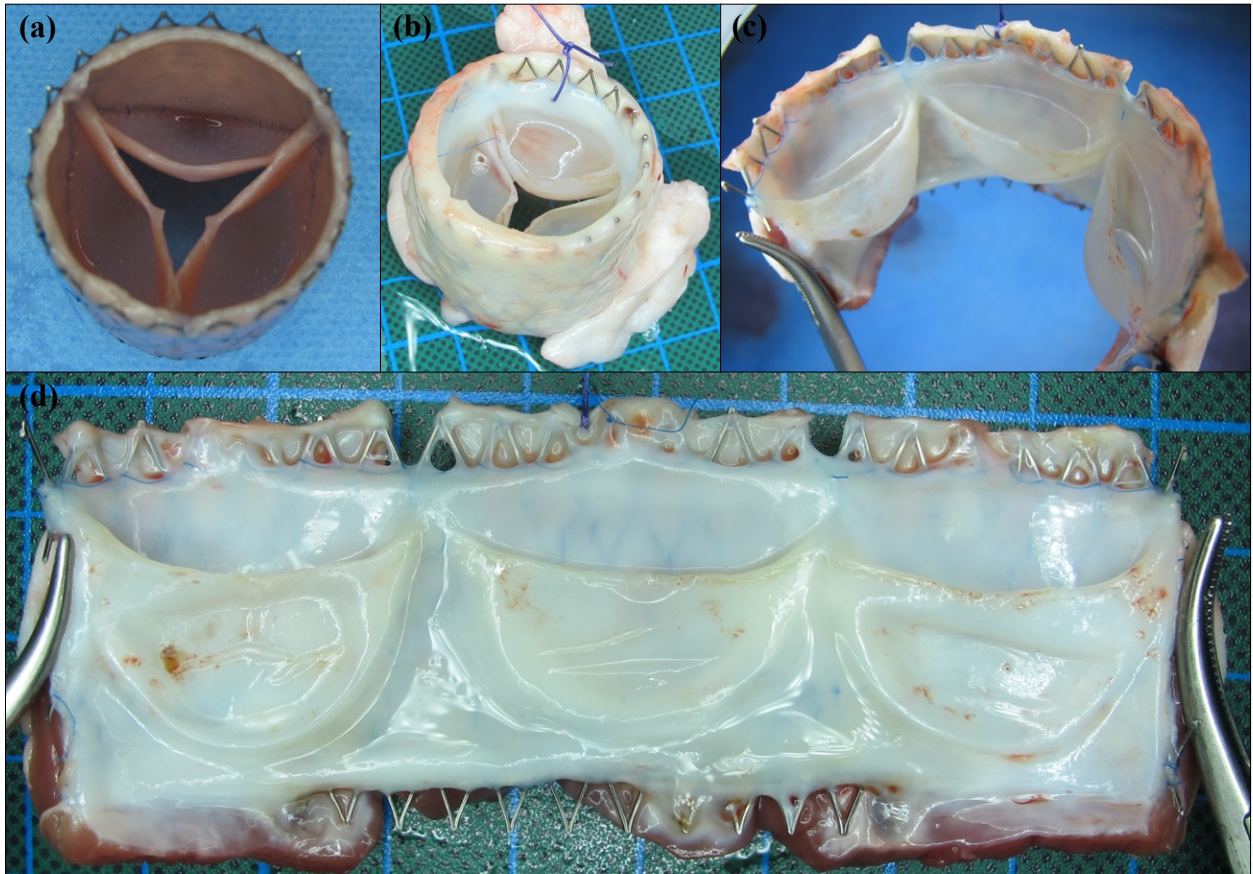


Abbildung 21: Makroskopische Befunde der Explantation.

(a) Gestentete dTEHV der 2. Generation vor Implantation. (b) dieselbe Klappe nach Explantation; (c) dieselbe Klappe nach Explantation, aufgeschnitten zwischen zwei Klappensegeln; (d) dieselbe Klappe nach Explantation in der lateralen Aufsicht der aufgeschnittenen Klappe. Weiche, mobile und bauchige Klappensegel sind erkennbar. Das Gewebe ist dünn, jedoch kräftig. Eine glänzende Endothelschicht überzieht das Klappengewebe.

Die Klappe des Schafs 58 (dTEHV B.2) wies im aortalen Segel des Explantats ein Loch auf, welches jedoch hämodynamisch keine relevante Auswirkung auf die Funktionalität der Klappe hatte (RF von 7,7 % zum Explantationszeitpunkt). Bei Betrachtung der dTEHV vor Implantation, war anhand von Fotos zu erkennen, dass im Gewebe eines der Klappensegels bereits vor Implantation eine Schwachstelle vorlag (Abbildung 22). Es liegt nahe, dass sich eben diese Schwachstelle durch die mechanische Belastung im Verlauf des Follow-ups zu einem Loch

erweiterte. Ebenfalls ein kleines Loch wie die Klappe des Schafs 61 (dTHEV C.1) auf (RF von 14,7% zum Explantationszeitpunkt).

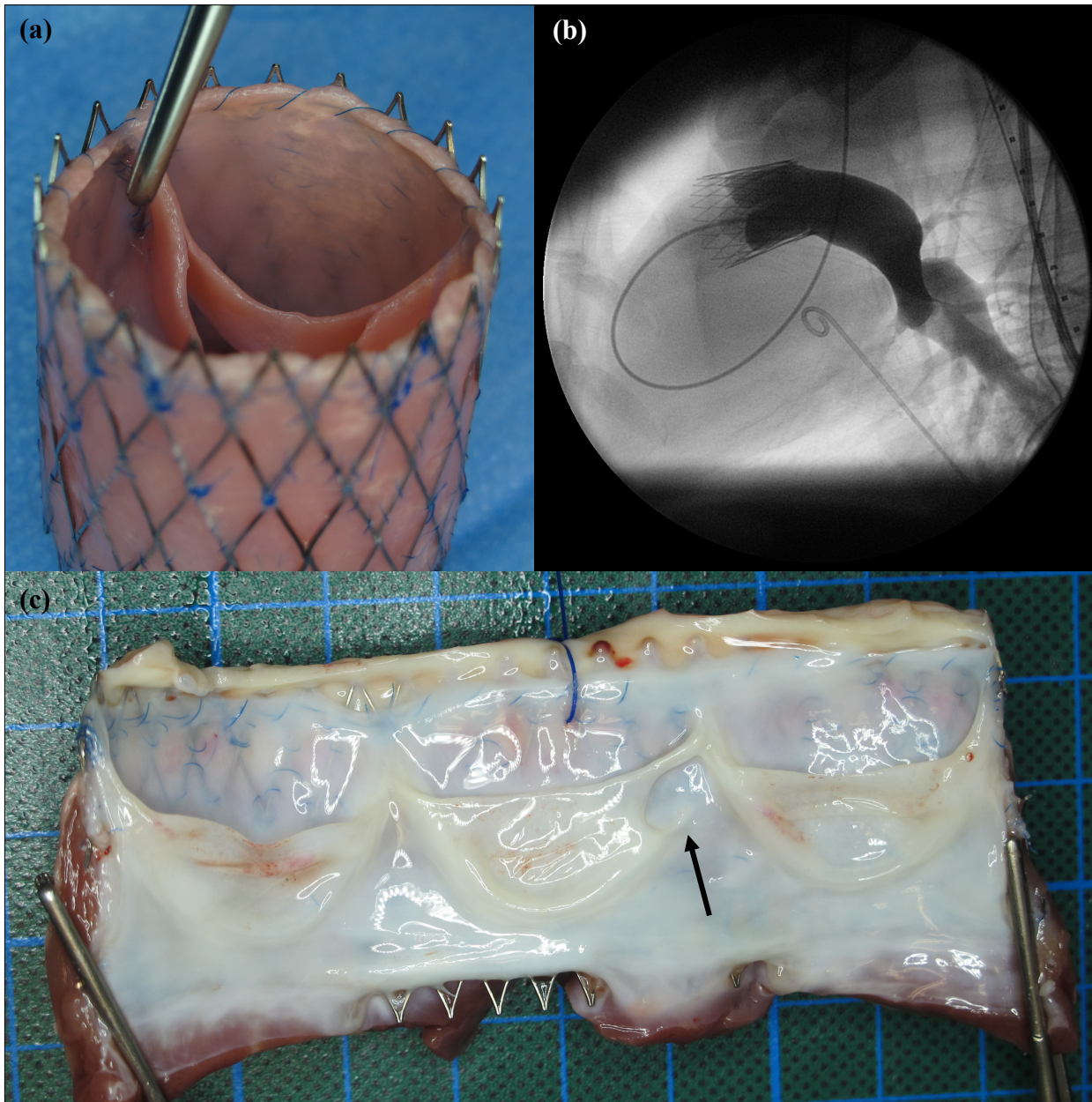


Abbildung 22: dTEHV B.2 (Schaf 58) vor Implantation und nach Explantation.

(a) dTEHV B.2 vor Implantation, eine Gewebeschwachstelle im Bereich des Segelansatzes ist zu erkennen (mit der Pinzette markiert); (b) Kontrastmittelangiographie von dTEHV B.2 direkt nach Implantation: Ein suffizienter Klappenschluss ist zu erkennen; (c) dTEHV B.2 nach Explantation: Das Loch im markierten Segel ist durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Die Tiefe des Klappensegels vom oberen Klappenrand bis zur Hinge Region wurde nach der Explantation der dTEHV erfasst. In ihrer Gesamtheit sind diese Ergebnisse recht homogen. Die jeweils geringsten Werte bilden für das aortale Segel der Klappe B.1 (Schaf 57) mit 18,6 mm und

für das rechts- bzw. linkslaterale Segel der Klappe E.3 (Schaf 62) mit 19,9 mm und 20,1 mm (Tabelle 15). Die Klappen der ersten Produktionsreihe wurden aus der Analyse der Hinge Region ausgeschlossen, um eine Vergleichbarkeit der Remodeling-Zeit zu bieten.

| | Aortales Segel | Rechtilaterales Segel | Linkilaterales Segel |
|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| n | 10 | 10 | 10 |
| Tiefe des Klappensegels in mm | 21,3 ± 1,8 (Range: 18,6 – 24,1) | 22,2 ± 1,1 (Range: 19,9 – 23,8) | 22,3 ± 1,2 (Range: 20,1 – 24,3) |

Tabelle 15: Tiefe der Hinge Region der drei Klappensegel in der explantierten dTEHV.

Die dTEHV der verschiedenen Produktionsreihen präsentierten sich in ihrer Makroskopie bei Explantation in unterschiedlicher Weise bezüglich der Tiefe der Klappensegel und dem generellen Erscheinen des Gewebes. Die Tiefe der Klappentaschen liefert ein makroskopisches Korrelat der Funktionalität der Klappen zum Explantationszeitpunkt. Auf die Gründe hierfür wird im Punkt 4.5 der Diskussion weiter eingegangen.

Beim Vergleich der Explantate der verschiedenen Produktionsreihen fallen auch makroskopische Unterschiede auf. In den Klappentaschen der früh explantierten dTEHV A.2 (Schaf 52) sind noch deutliche Scaffoldreste zu erkennen. In allen ab Woche 24 explantierten dTEHV war makroskopisch kein Scaffold mehr sichtbar, jedoch unterschieden sich die einzelnen Produktionsgruppen in ihren anatomischen Strukturen. Klappe E.4 wies beispielsweise keinen Nodus am zentralen Anteil der Lunula der einzelnen Klappentaschen auf, bei den Klappen C.2 (Schaf 63) und D.3 (Schaf 65) war ein kleiner Nodus erkennbar. Ebenso wirkte die Lunula, sowie die gesamte Gewebestruktur der Klappe E.4 (Schaf 100) vergleichsweise eher fest und rigide. Dem gegenüber stehen vor allem die Explantate C.2 und D.3, bei denen sich eine feine, durchscheinende und gut bewegliche Segelstruktur darstellte (Abbildung 23). Tabelle 16 gibt einen Überblick über die makroskopischen Ergebnisse nach Explantation an.

| Schaf Nummer | dTEHV | Auflagerungen | Scaffoldreste | Nodulus | Lunula | Klappensegel | Loch |
|----------------------|-------|-----------------------|---------------|---------|--------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| 51 | A.1 | - | + | - | nicht ausgebildet | ähnlich zum implantierten Gewebe | - |
| 52 | A.2 | - | + | - | nicht ausgebildet | Reduzierte Segelfläche in einem Segel | Segelabriss |
| 53 | A.3 | - | - | - | zart | zart, homogenes Gewebe | - |
| 54 | A.4 | - | + | - | nicht ausgebildet | reduzierte Segelfläche | Segelabriss, Loch |
| 55 | A.5 | - | - | - | zart – fest/rigide | zart, homogenes Gewebe | - |
| 56 | A.6 | - | + | - | nicht ausgebildet | deutlich reduzierte Segelfläche | Segelabriss, großes Loch |
| 57 | B.1 | - | - | - | zart – fest/rigide | zart, homogenes Gewebe | - |
| 58 | B.2 | - | - | - | zart | zart, homogenes Gewebe | + |
| 61 | C.1 | - | - | - | zart | zart, homogenes Gewebe | + |
| 63 | C.2 | - | - | + | zart | zart, homogenes Gewebe | - |
| 60 (Doppelklappe) | D.1 | - | - | - | fest/rigide | zart, homogenes Gewebe | - |
| 64 | D.2 | - | - | - | zart | zart, homogenes Gewebe | - |
| 65 | D.3 | - | - | + | zart | zart, homogenes Gewebe | - |
| 73 | E.1 | Septische Absiedelung | - | - | zart | zart, homogenes Gewebe | - |
| 75 | E.2 | - | - | - | zart | zart, homogenes Gewebe | - |
| 62 | E.3 | - | - | - | zart | zart, homogenes Gewebe | - |
| 100 | E.4 | - | - | - | fest/rigide | zart, homogenes Gewebe | - |

Tabelle 16: Übersicht über die makroskopischen Explantationsergebnisse.

Legende: + = positives Ergebnis. - = negatives Ergebnis.

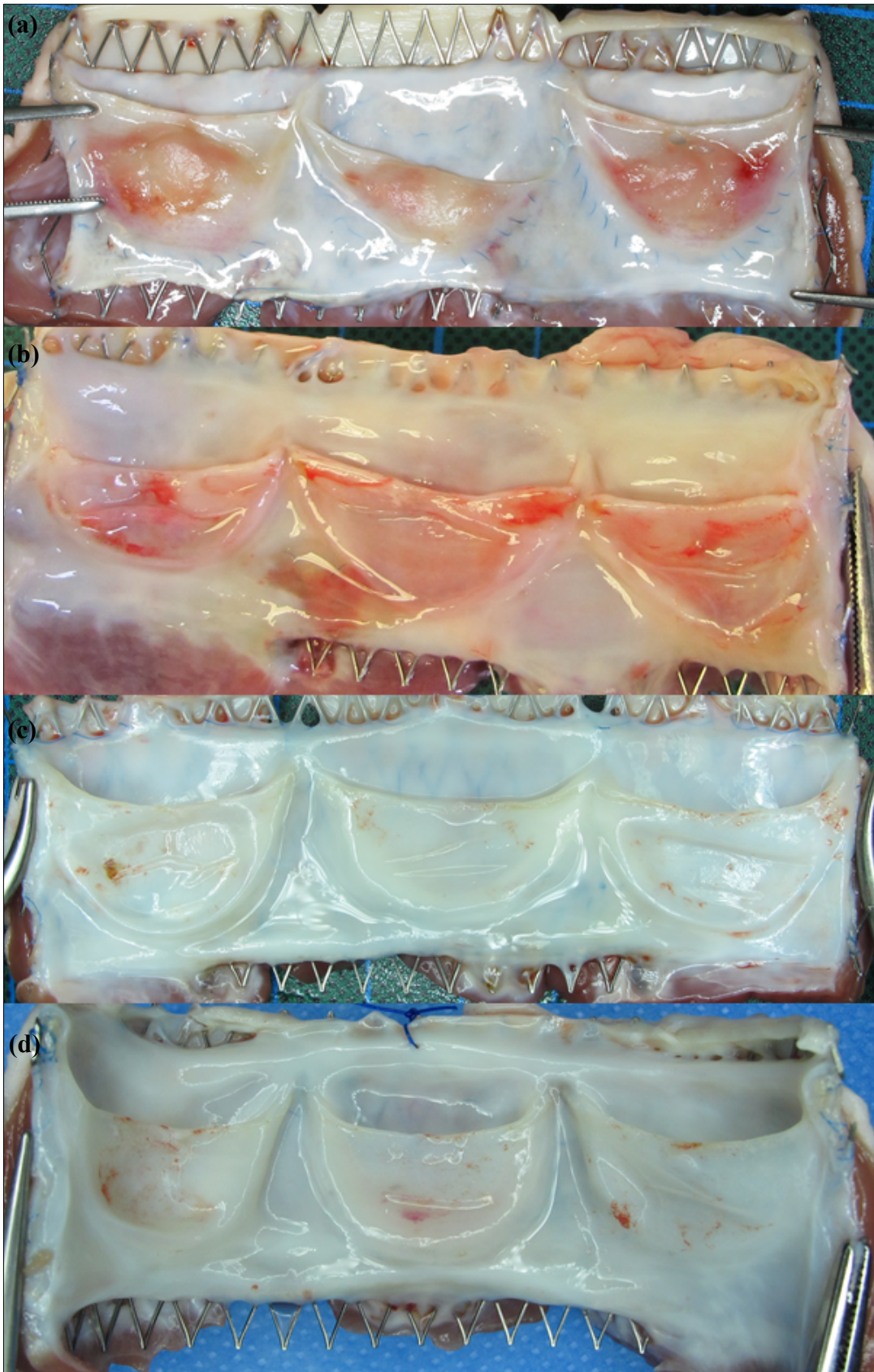


Abbildung 23: Makroskopie der Klappentaschen.

(a): A.2; (b): C.2; (c): D.3; (d): E.4. Gut zu erkennen sind die restlichen Scaffold-Anteile in den Klappensegeln der dTEHV A.2, welche bereits nach 8 Wochen explantiert wurde.

3.5 Histologie

Insgesamt wurden 17 Präparate von dTHEV-Grafts untersucht. Von den ursprünglich 18 implantierten Klappen wurde nur die dTEHV A.7 nicht histologisch begutachtet, da das Schaf 72 noch während der Implantationsprozedur verstarb.

Alle Präparate zeigten in der Histologie eine gleichmäßige Entfaltung des Stentgrafts. Die Grafts waren mehrheitlich auf Höhe der nativen Pulmonalklappe positioniert. In drei Fällen (dTEHV D.3, E.1 und E.2 entsprechend Schaf 65, 73, 75) ragte die proximale Stentkante teilweise in den RVOT, folglich war die Anlagerung des Stentgrafts an die Wand des RVOT unvollständig. Tabelle 17 gibt die histologischen Ergebnisse zusammenfassend an.

3.5.1 Endothelialisierung und Einwachsen

Alle explantierten Klappen bis auf A.1 zeigten eine oberflächliche Endothelialisierung, sowohl an der Klappenwand als auch auf den Klappensegeln. Jedoch zeigten nicht alle dTEHV eine gleich stark ausgeprägte Endothelialisierung. So war die Graftwand der Klappen A.1 (Schaf 51) und A.2 (Schaf 52) beispielsweise geringer (A.2 zeigte auf nicht allen Klappenabschnitten eine Endothelschicht mit einer Neointimaschicht von etwa 300 µm Dicke) bis gar nicht (A.1 zeigte keinen Nachweis einer Endothelschicht) endothelialisiert. Möglicher Grund hierfür könnte der frühe Explantationszeitpunkt sein.

Das Einwachsen des Stents in das umliegende Gewebe wurde bei allen dTEHV, außer bei Klappe A.1 histologisch bestätigt. Ebenso verwuchs der Scaffold mit der Pulmonalarterie bei allen Tieren. Klappe A.1 wurde bezüglich dieser Fragestellung nicht untersucht.

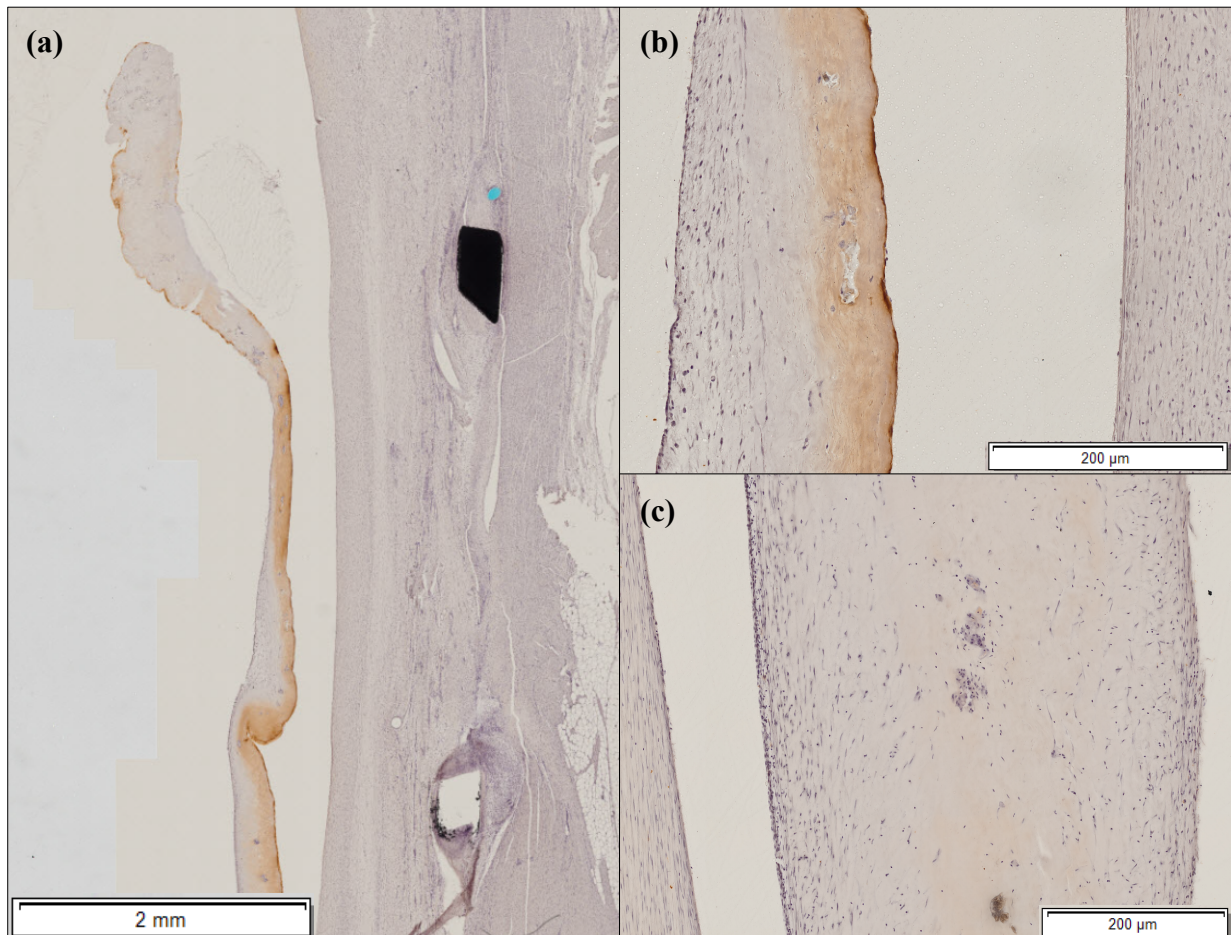


Abbildung 24: Anti-vWF-Färbungen der explantierten dTEHV.

(a): dTEHV E.3 (Schaf 62) nach Explantation. (b): dTEHV E.3 in höherer Vergrößerung. (c): Durchgehende Endothelschicht auf Segel und Graftwand der dTEHV E.2 (Schaf 75).

3.5.2 Neovaskularisierung

Alle Klappen zeigten eine Neovaskularisierung der Graftwand, bis auf dTEHV A.1, welche schon eine Woche nach Implantation explantiert wurde (Tabelle 14). Die Streben des Stents waren in jedem Fall von Bindegewebe, im Sinne von α -SMA-positiven Myofibroblasten in einer kollagenreichen extrazellulären Matrix, umwachsen.

Neovaskularisationen in den Klappensegeln waren hingegen in keiner der untersuchten dTEHV vorhanden.

3.5.3 Gewebe und Zellen

Das neu gebildete Gewebe in den Klappentaschen wies bei allen Präparaten Kollagen, jedoch keine elastischen Fasern in der Movat-Pentachrom-Färbung auf. Hierbei eröffnen sich bereits kleine Unterschiede bezüglich der EZM der dTEHV-Explantate und nativer Pulmonalklappen, bei

denen durchaus elastische Fasern in den Klappentaschen zu finden sind [6]. Dem gegenüber stehen histologische Ergebnisse von Untersuchungen derselben Klappen unserer Konsortialpartner aus Zürich, in welchen teilweise Elastinfasern in einer van Gieson-Färbung dargestellt werden konnten [67].

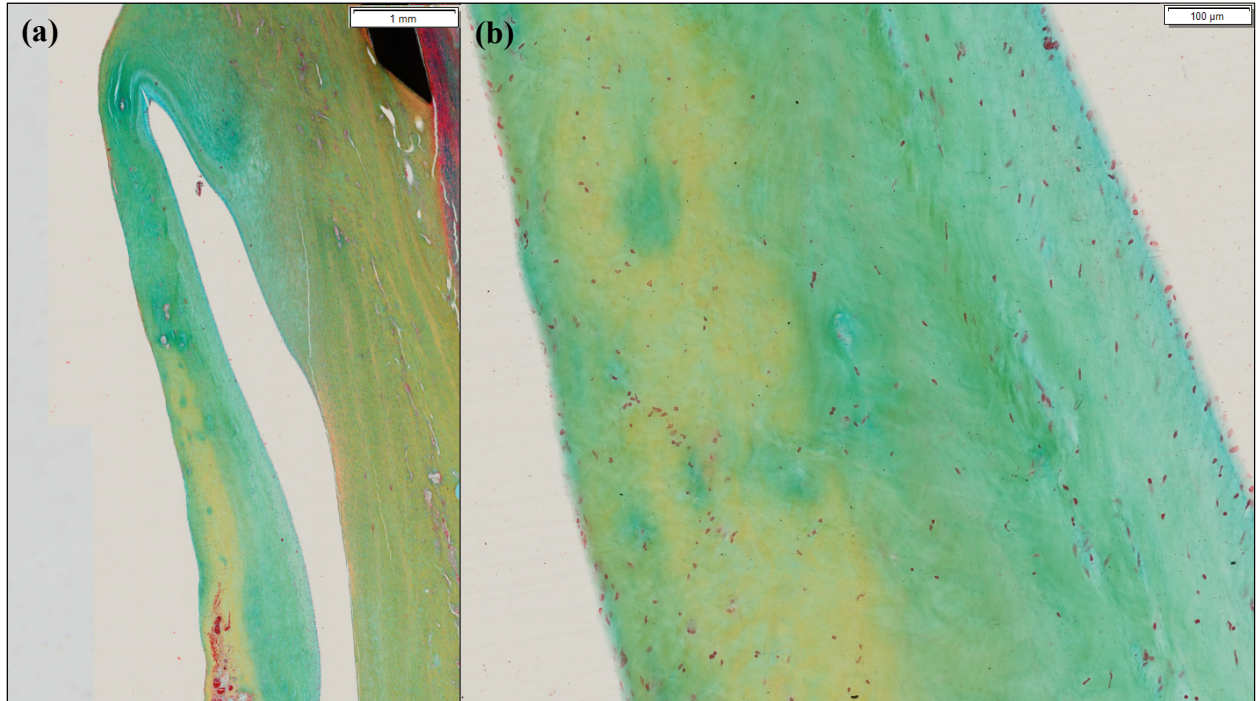


Abbildung 25: Movat-Pentachrom Färbung der dTEHV D.2 (Schaf 64)

Es sind kollagene Fasern im Bereich des Klappensegels zu erkennen. Legende Movat-Pentachrom-Färbung: schwarz = Zellkerne, elastische Fasern. Blau = Glykoproteine, extrazelluläre Matrix. Gelb = Kollagen, retikuläre Fasern. Rot = Fibrin (hell), Muskelzellen (dunkel). (a): im Bereich der Segelspitze sind noch einzelne Scaffoldreste zu erkennen. (b): In der höheren Auflösung lässt sich eine Mehrschichtung des Gewebes erkennen.

3.5.4 Entzündungsreaktion

Entzündungsreaktionen waren in allen untersuchten Explantaten nachweisbar. Lymphozytäre Infiltrationen oder einzelne Lymphzyten konnten im neu gebildeten Gewebe ohne unmittelbaren Kontakt zum Scaffold oder den Metallstreben des Stents gefunden werden. Die lymphozytären Infiltrationen waren meist gemischt B- und T-lymphozytär.

Alle Präparate zeigten eine ausgeprägte Fremdkörperreaktion im Bereich des Scaffolds der Graftwand. Hier konnte eine Ansammlung von Makrophagen (Histiozyten) und die Ausbildung von Fremdkörper-Riesenzellen beobachtet werden. Granulozytenansammlungen, als Ausdruck einer akuten Entzündungsreaktion wurden in der immunhistochemischen Untersuchung nicht

gefunden. Einzige Ausnahme hierbei bildet das Präparat des Schafs 73 (dTEHV E.1). Hier war makroskopisch eine blumenkohlartige Struktur auf der dem RVOT zugewandten Seite des Klappensegels zu erkennen. Histologisch ist diese Struktur zur Oberfläche der Klappe gut abgrenzbar, es besteht keine Infiltration des Klappengewebes. Sowohl basal als auch im Randbereich weist die Auflagerung einen hämorrhagischen Randsaum auf. Histologie und Makroskopie legen eine entzündliche Genese im Sinne einer primären Endokarditis oder einer septischen Absiedelung nahe (Abbildung 26).

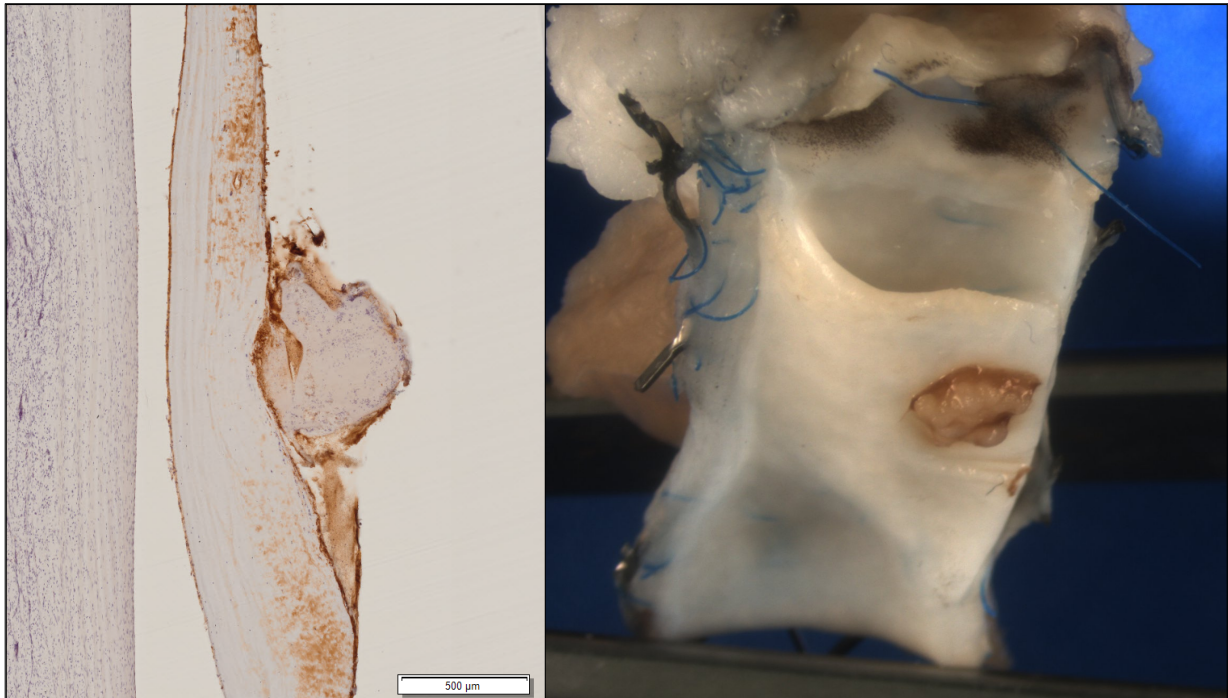


Abbildung 26: Septische Absiedelung auf dem Explantat der dTEHV E.1.

(a) vWF des Präparates; (b) Makroskopisches Präparat vor der histologischen Aufbereitung

3.5.5 Verkalkung

Das Vorliegen von Verkalkungen konnte nur bei vereinzelt dTEHV untersucht werden, da nur begrenzt Klappenmaterial zur histologischen Aufbereitung zur Verfügung stand. Von den untersuchten dTEHV zeigten die Klappen der Tiere 54 (A.4), 55 (A.5), 58 (B.2) und 65 (D.3) keine Verkalkungen. Hingegen waren auf den Klappen der Tiere 60 (D.1) und 63 (C.2) deutliche Kalkeinsprengungen am Klappenansatz bzw. der Klappentasche zu erkennen (Abbildung 27). Da bei Schaf 60 die native Pulmonalklappe nicht überstentet wurde während der Implantationsprozedur, besaß dieses Schaf eine „Doppelklappe“ mit einer folglich nicht physiologischen Hämodynamik um die neu implantierte dTEHV. In den Standardfärbungen zeigte sich bei allen anderen Präparaten kein Anhalt für Kalkablagerungen. Auf die Entstehung dieser

Kalkeinsprengungen und deren Relevanz wird zu einem späteren Zeitpunkt im Diskussionsteil weiter eingegangen (siehe 4.3.4).



Abbildung 27: Von Kossa-Färbung einer explantierten dTEHV.

Deutliche Kalkeinsprengungen sind in schwarzer Farbe auf dem Klappensegel sichtbar, hier exemplarisch im Präparat der dTEHV C.2.

3.5.6 Thromben und Nekrosen

Thromben wurden in den Klappenrezessus der Klappen A.1, A.2 und A.4 gefunden. Alle diese Tiere wurden zu einem sehr frühen Zeitpunkt explantiert. Bei allen Tieren mit längerer Standzeit waren nach Explantation keine Thromben in den Klappensegeln vorhanden. Darüber hinaus wurden in keinem der Explantate Nekrosen der pulmonalarteriellen Wand, oder Fibrinauflagerungen am Klappenrand gefunden.

| Tiernummer | Oberflächliche Endothelialisierung | | Entzündungsreaktionen | | | | | Verkalkung** | Neovaskularisierung | | Klappenrezessus | Fibrinauflagerung Klappenwand | Nekrose (PA-Wand) | |
|------------|------------------------------------|--------|-----------------------|-------|--------------|-------------|-----------------|--------------|---------------------|--------|-----------------|-------------------------------|-------------------|--------|
| | Graufwand | Klappe | Scaffold – PA | Stent | Granulozyten | Lymphozyten | Makrophagen/FKR | | Graufwand | Klappe | | | | Gewebe |
| 51 | +/- | +/- | n.u. | - | 0 | 0 | 0 | n.u. | - | - | +/- | + | - | - |
| 52 | +/- | +/- | + | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | + | - | - |
| 53 | + | + | +/- | + | 0 | 0 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - |
| 54 | + | +/- | +/- | + | 0 | 1 | 1 | (-) | + | - | - | + | - | - |
| 55 | + | + | + | + | 0 | 1 | 1 | (-) | + | - | - | - | - | - |
| 56 | + | + | +/- | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - |
| 57 | + | + | + | + | 0 | 1 | 2 | n.u. | + | - | - | - | - | - |
| 58 | + | +/- | + | + | 0 | 1 | 1 | (-) | + | - | - | - | - | - |
| 60 | + | + | + | + | 0 | 1 | 1 | + | + | - | - | - | - | - |
| 61 | + | +/- | + | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - |
| 63 | + | + | +/- | + | 0 | 1 | 1 | + | + | - | - | - | - | - |
| 62 | + | + | + | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - |
| 64 | + | + | + | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - |
| 65 | + | +/- | +/- | + | 0 | 1 | 1 | (-) | + | - | - | - | - | - |
| 73 | + | + | +/- | + | 1 | 1 | 1 | n.u. | + | - | - | - | - | - |
| 75 | + | + | +/- | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | + | - | - | - |
| 100 | + | + | + | + | 0 | 1 | 1 | n.u. | + | - | + | - | - | - |

Tabelle 17: Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse.

Legende: + = positives Ergebnis. - = negatives Ergebnis. PA = Pulmonalarterie; n.u. = nicht untersucht. Graduierung Entzündungsreaktionen: 0 – nicht nachweisbar, 1 – gering ausgeprägt, 2 – mäßig ausgeprägt. ** Verkalkungen untersucht mittels von Kossa-Färbung, jedoch nur bei den Tieren 60 (Klappe D.1) und 63 (C.2) mit Anteilen der Taschenklappen im gefärbten Schliffpräparat (beide positiv für Kalk). Diese Tabelle wurde im Auftrag unserer Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Matthias Sigler vom Herzzentrum Göttingen, Abteilung für Pädiatrische Kardiologie und Intensivmedizin angefertigt und mit freundlicher Genehmigung für die Verwendung in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass dezellularisierte, tissue engierte Herzklappen (dTEHV) über einen Zeitraum von 12 Monaten eine adäquate Funktionalität aufweisen.

Von 18 durchgeführten Implantationen gelangen 16 ohne Komplikationen. Ein Schaf musste aus dem Versuch ausgeschlossen werden, da die Klappe hierbei zu weit distal implantiert wurde, was in einer Doppelklappe resultierte (Tier 60, Klappe D.1). Anfänglich gab es Probleme mit der Stabilität der Klappensegel, sodass drei der ersten fünf implantierten dTEHV bereits initial moderat bis schwer insuffizient wurden (A.2, A.4, A.6). In der Folge wurde das Protokoll der Klappenkultivierung im Bioreaktor so angepasst, dass die formgebenden Plastik-Inserts erst 10 bzw. 13 Tage nach Beginn der Inkubation der wachsenden TEHV beigegeben wurden. Die fortan implantierten 10 dTEHV zeigten initial eine exzellente Klappenfunktion im MRT (mediane Regurgitationsfraktion: 9%) und ICE (8 dTEHV ohne und lediglich 2 mit leichter Insuffizienz). CT Bilder ergaben, dass sich der Nitinolstent, in den die dTEHV eingenäht wurde, gut entfaltet und seine Form bis zur Explantation annähernd beibehielt.

Neun der Klappen erreichten die angesetzte Nachbeobachtungszeit von 52 Wochen, ein Tier musste aufgrund einer Regurgitationsfraktion (RF) $> 30\%$ im MRT (prädefinierter Endpunkt) vorzeitig euthanasiert werden. Zum Explantationszeitpunkt 52 Wochen nach Implantation betrug die mediane RF 14,2%.

Es ergab sich im gesamten Zeitraum des Follow-up kein Anhalt für eine Stenosierung der Klappe. Zu keinem Messzeitpunkt konnten erhöhte Druckdifferenzen zwischen rechtem Ventrikel und Pulmonalklappe nachgewiesen werden, ebenso konnte keine relevante Flussbeschleunigung festgestellt werden.

In der makroskopischen Beurteilung nach Explantation präsentierten sich die dTEHV mit einer zarten, weißlich-glänzenden Segelstruktur. Es lagen keine Thromben vor. Lediglich ein Tier wies eine Auflagerung an der ventrikulären Seite eines Segels auf, welche im Sinne einer septischen Absiedelung gedeutet wurde. Es lagen keine sichtbaren Verwachsungen zwischen Klappensegel und der Konduitwand vor.

Die histologische Analyse ergab eine vollständige Re-Endothelialisierung sowohl der Klappensegel, als auch der Konduitwand, nur noch wenige Anteile des Scaffolds waren vorhanden. Der Stent war vollständig am RVOT und dem Pulmonalarterienstamm angewachsen. Die Segel selbst bestanden hauptsächlich aus kollagenen Fasern, elastische Fasern konnten in der von uns durchgeführten Histologie nicht nachgewiesen werden. Auch histologisch zeigte sich keine Fusion zwischen Klappensegel und Konduitwand.

4.2 Lernkurve

Der schnelle Wissenszuwachs und die direkte Anpassung der Kultivierung der dTEHV im Bioreaktor aufgrund der anfänglichen Probleme beim Crimping und den ersten Implantationen spiegelt sich in einer steilen Lernkurve wider. Im Vergleich der fünf implantierten Klappen vor Änderung der Kultivierung und der 10 danach implantierten Klappen wird die starke Verbesserung der Funktionalität, welche durch das neue Kultivierungsprotokoll hervorgerufen wurde, ersichtlich. Die ersten fünf Implantationen mit dTEHV der neuen Geometrie sollten als eine erste Weiterentwicklung der ursprünglichen dTEHV der ersten Generation angesehen werden – eine Generation dTEHV1.1, aus welcher die stabilen dTEHV2.0 hervorgingen.

Auch Gottlieb et al. erfuhren in ihrer 2010 veröffentlichten Studie über die chirurgische Implantation autologer, tissue engineerter Herzklappen, technische Schwierigkeiten im Prozess der Implantation. Hierbei verstarben sogar 9 von 19 zur Implantation herangezogenen Schafen in der ersten Woche [68].

Die Fehlpositionierung der dTEHV bei Schaf 60, welche zur Entstehung einer Doppelklappe führte, hätte eventuell durch die Anwendung eines rapid ventricular pacings⁷ [69] vermieden werden können [70]. Selbst bei längeren Zeiten des ventrikulären Pacings besteht kein erhöhtes Risiko für einen etwaigen Myokardschaden [71]. Ähnlicherweise könnte eine Adenosin-induzierte Asystolie die Herzbewegung minimieren und somit die Genauigkeit bei der Ablage des Stents verbessern [72, 73]. Die Positionierung des Stents selbst könnte durch einen Rückhalte Mechanismus im Ablagesystem, welches von der Firma Medtronic mit dem CoreValve™ Evolut R™ TAVR System angeboten wird, verbessert werden. Dieses System ermöglicht es, die zu implantierende Klappe zurück zu ziehen und zu repositionieren, bevor man sie vollständig frei gibt [74].

Zu einer weiteren Verbesserung der Implantationstechnik und dem Zusammenspiel der minimalinvasiven Implantationsmethode und dem Crimpingprozess sind diese Ansätze in Betracht zu ziehen.

⁷ Rapid ventricular pacing beschreibt ein Vorgehen, bei dem eine Elektrode in die Spitze des rechten Ventrikels vorgeschoben wird und dann über elektrische Stimulation eine Herzfrequenz von etwa 180-220 Schlägen/Minute induziert wird. In der Folge sinkt der Pulsdruck und der kardiale Auswurf 69. Webb, J.G., S. Pasupati, L. Achtem, and C.R. Thompson, *Rapid pacing to facilitate transcatheter prosthetic heart valve implantation*. Catheter Cardiovasc Interv, 2006. **68**(2): p. 199-204..

4.3 Vergleich mit aktuellen Studien

4.3.1 Defekte

Einer der maßgeblichen Befunde der ersten Implantationen der Tiere 52-56 waren Löcher oder Risse in den Klappensegeln. Auch bei Schaf 58 (Klappe B.2) und 61 (Klappe C.1) präsentierten sich nach der Explantation der Klappen, Löcher in diesen, welche hier jedoch keine große hämodynamische Relevanz zu haben schienen, da die Klappen bis zum Ende der Nachbeobachtungszeit eine gute Funktionalität aufwiesen (B.2 hatte eine RF von 7,7 % nach 52 Wochen, C.1 zum gleichen Zeitpunkt eine RF von 14,7%). Die Klappe bei Schaf 54 (A.4) und 56 (A.6) wurde vermutlich zusätzlich während des Rückzugs der Katheterspitze beschädigt und ein Teil des Segels abgerissen, wie der Explantationsbefund nahelegt (siehe 3.3.1). In den anderen Fällen ist eine andere Erklärung für die strukturelle Beschädigung plausibler. So beschreiben Khoffi et al. in einer 2015 veröffentlichten Arbeit, dass durch das Crimping einer biologischen Klappe aus Rinderperikard eine Verschlechterung der Materialstruktur induziert wird und in der Folge die mechanische Belastbarkeit der Klappensegel um bis zu 50% herabgesetzt wurden [75]. Auch bei den Klappensegeln der Melody® Klappe war die Inzidenz von Gewebeerletzungen in einem in-vitro Experiment signifikant höher bei Klappen, die einem Crimping-Prozess unterzogen wurden, im Gegensatz zu einer Kontrollgruppe, in der die Klappen nicht gecrimpt wurden [76]. Ein direkter Schaden der Gewebestruktur unserer zuerst implantierten Klappen erscheint also sehr wahrscheinlich. Dieser Schaden führte vermutlich zu einer herabgesetzten mechanischen Belastbarkeit der Klappensegel und letztendlich zu einer weiteren Verschlechterung. Alavi et al. beschrieben in einer 2014 veröffentlichten Arbeit, dass das Crimping einer mit Glutaraldehyd fixierten Perikardklappe einen Gewebeschaden hervorruft, welcher sich vor allem auch über die Zeit nach Implantation nicht regeneriert [77], was jedoch in diesem Fall zusätzlich auf einen fehlenden Remodeling-Prozess bei Glutaraldehyd-fixierten Perikardklappen zurückzuführen ist. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Bourget et al. 2016 publiziert, hierbei wurde vorgeschlagen Verletzungen durch Stentstreben durch eine Puffer-Schicht zwischen diesen beiden Strukturen zu minimieren [78]. Bei der Klappe des Tiers 58 war schon vor der Implantation ein kleiner Defekt im oberen Teil der Hingeregion sichtbar. Es liegt nahe, dass sich dieser Defekt durch die mechanische Belastung während des Crimpings vergrößert hat und folglich einen definitiven Strukturschaden innerhalb der Klappe hervorrief. Aufgrund der peripheren Lokalisierung des Lochs (siehe 3.3.1) und einer weiterhin großen Koaptationszone dieser Klappe (3 mm zum Explantationszeitpunkt) wurde dieser Defekt vermutlich durch das angrenzende rechtslaterale Klappensegel abgedeckt und verursachte dadurch keine große hämodynamisch relevante Regurgitation in den RVOT.

4.3.2 Stenosierung

In der von uns durchgeführten Studie zeigte sich ein exzellentes Öffnungsverhalten der dTEHV. Über den Follow-up Zeitraum von 52 hinweg wurde kein erhöhter Druckgradient über der Pulmonalklappe oder eine Flussbeschleunigung im MRT oder der ICE beobachtet. Es lag daher kein Anhalt für eine Stenosierung der implantierten dTEHV vor. Eine milde Stenosierung scheint in-vivo keine größere Komplikation zu sein, da bei vielen anderen Arbeitsgruppen, die tissue engierte Herzklappen entweder minimalinvasiv oder chirurgisch implantierten keine Zeichen für eine Stenosierung in der makroskopischen Begutachtung eines Explantats oder während des in-vivo Monitorings auftraten [53, 79-81].

4.3.3 Zentrale Insuffizienzen

Trotz einer insgesamt guten Funktionalität der im Rahmen dieser Studie implantierten dTEHV über den Nachbeobachtungszeitraum entwickelten sich schon 4 Wochen nach Implantation leichte zentrale Insuffizienzen bei weiterhin vorhandener Koaptation in den peripher liegenden Abschnitten der Klappensegel. Diese waren sowohl im ICE durch farbkodierte Doppler-Aufzeichnungen, als auch im MRT sichtbar. Manche Klappen, wie etwa dTEHV E.4, waren stärker von den zentralen Insuffizienzen betroffen, was die Frage nach Gründen für diese Entwicklung aufwirft. Gottlieb et al. beobachteten ein ähnliches Phänomen in ihrer 2010 veröffentlichten Studie zum in-vivo Monitoring autologer engineerter Pulmonalklappen. Hierbei überstiegen die erfassten Werte der im MRT bestimmten Regurgitationsfraktion die in unserer Studie gemessenen Werte sogar deutlich (Mittelwerte: 15,9% nach 3 Wochen [Gottlieb et al.] vs. 8% nach 4 Wochen [unsere Studie], 32,0% nach 6 Wochen [Gottlieb et al.] vs. 9,67% nach 8 Wochen [unsere Studie], 21,7% nach 10 Wochen [Gottlieb et al.] vs. 9,73% nach 12 Wochen [unsere Studie]). Gottlieb et al. konnten diese zunehmenden Regurgitationen durch die von ihnen implantierten Klappen durch eine Segelverkürzung, welche ein Koaptationsdefizit hervorriefen, erklären [68]. Der Zusammenhang mit einer Segelverkürzung scheint in unserer Studie jedoch nicht klar erwiesen. Beispielhaft lag die Tiefe der Hinge Region des dTEHV-Explantats der Klappe E.4 etwa im Durchschnitt aller explantierten dTEHV, jedoch war die Regurgitationsfraktion hier mit 25,7% 52 Wochen nach Implantation deutlich über dem Durchschnitt aller dTEHV zu diesem Zeitpunkt (13,93%).

Reimer et al. beobachteten in einer ihrer 2017 veröffentlichten Studie „*Implantation of a Tissue-Engineered Tubular Heart Valve in Growing Lambs*“ ebenfalls zunehmende Insuffizienzen bei in

Aortenposition chirurgisch implantierten tissue engineerter Herzklappen. Hierbei musste jedoch neben einer Segelverkürzung auch der steigende Durchmesser der Aortenwurzel bei den für die Implantationen verwendeten wachsenden Lämmer als entscheidender Faktor in Betracht gezogen werden [12]. Dieser Faktor kann in der von uns durchgeführten Studie vernachlässigt werden, da wir zur Implantation ausschließlich ausgewachsene Tiere verwendeten. Zwar nahmen die Schafe unserer Studie im Verlauf des Versuchs deutlich an Gewicht zu und auch das enddiastolische Volumen des rechten Ventrikels vergrößerte sich kongruent mit dem Gewicht. De Divitiis et al. beschrieben bereits 1981 den Zusammenhang zwischen Körpergewicht und dem enddiastolischen Volumen des rechten Ventrikels [82]. Jedoch veränderte sich der mittlere Durchmesser des Stents nicht signifikant, daher ist auch eine zentrale Insuffizienz nicht auf eine Zunahme der Wurzel der Klappe zurück zu führen.

In der histologischen Analyse unserer explantierten dTEHV fiel auf, dass die extrazelluläre Matrix vor allem aus kollagenen Fasern bestand. Elastische Fasern wurden lediglich in der Histologie unserer Konsortialpartner nachgewiesen [67]. Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, ist Elastin jedoch ein physiologischer Bestandteil der extrazellulären Matrix bei Pulmonalklappensegeln und wird nur in der Entwicklung (Embryonalzeit) gebildet.

Mit Bezug auf die Aortenklappe schrieb Ivan Vesely 1998 im *Journal of Biomechanics*, dass Elastin eine wichtige Rolle dabei spielt, die Kollagenfasern zurück in ihre Konformation zu bewegen, sobald mechanische Belastungen während der Diastole beendet wurden. Ein physiologisches Verhältnis zwischen elastischen und kollagenen Fasern ist daher entscheidend für eine korrekte Klappenfunktion [83]. Diese Erkenntnisse über die Aortenklappe sind zwar nur bedingt auf die Pulmonalklappe zu übertragen, da hier grundlegend höhere Drücke präsent sind, jedoch lässt sich hieraus die große Bedeutung des Zusammenspiels der einzelnen Komponenten der EZM eines Klappensegels ableiten.

Beim Vergleich der Makroskopie unserer Explantate mit der normalen Anatomie der Pulmonalklappe fällt auf, dass eine sehr bauchige Form der Taschen erzielt wurde und diese Taschen am oberen Rand durch eine gut ausgebildete Lunula gesäumt werden. Allerdings fehlt die Ausbildung der zentralen Verdickung der Lunula, der Nodus. Dieser hilft während der Diastole zentrale Bereiche der Klappe abzudichten. Ein möglicher Grund für die vorwiegend zentralen Insuffizienzen könnte also sein, dass die Klappensegel aufgrund eines fehlenden Nodus ein zentrales Koaptationsdefizit aufwiesen, bei ansonsten suffizienter Koaptation. Eine Interaktion histologischer Begebenheiten sowie der anatomischen Verhältnisse bei den von uns implantierten dTEHV sind daher wahrscheinlich. Ursachen für diese unterschiedliche Entwicklung werden im Abschnitt 4.5 der Diskussion weiter erörtert.

4.3.4 Kalzifizierungen

Die Standardfärbungen der Explantate unserer Studie ergaben keinen Anhalt für eine Kalzifizierung der Klappen. In den durchgeführten Kossa-Färbungen der Immunhistochemie wurde jedoch bei zwei Klappen (dTEHV C.2 und D.1) eine Verkalkung nachgewiesen. Da Kalkauflagerungen für die Langzeitfunktionalität bzw. Degeneration von Klappenprothesen von großer Bedeutung sind, ist dieser Befunde näher zu betrachten.

Syedain et al. stellten im Rahmen ihrer Implantationen einer tissue engineerter Aortenklappe keinerlei Kalzifizierungen fest. Jedoch wurden die Klappen hierbei schon nach 24 Wochen explantiert und histologisch aufbereitet [81]. In diesem Zeitraum wurden auch in der Vorläuferstudie zu der von uns durchgeführten Studie von Schmitt et al. mit einer sehr ähnlich kultivierten dTEHV noch keinerlei Kalzifizierungen festgestellt [55].

Tissue engineerter Klappen scheinen dessen ungeachtet, was die Bildung von Kalk auf den Klappensegeln betrifft, einen klaren Vorteil zu besitzen. Tudorache et al. verglichen 2013 dezellularisierte, mit autologen Endothelzellen rezellularisierte und anschließend in einem Bioreaktor kultivierte autologe Aortenklappen mit herkömmlichen kryokonservierten Allografts. Nach drei Monaten zeigten sich in der Kossa-Färbung der Klappentaschen Zeichen der Kalzifizierung und deutliche Ansammlungen von Kalzium in der Graftwand der Gruppe der kryokonservierten Allografts. Demgegenüber wurden keine histologischen Korrelate einer Verkalkung der Klappensegel oder Arterienwand in der Gruppe der engineerter Klappen gefunden. Generell schlossen die Autoren hierbei, dass dezellularisierte Aorten-Allografts eine geringere Degeneration aufwiesen im untersuchten Zeitraum, als kryokonservierte Allografts [84]. Dezellularisierte Aortenhomografts zeigten in einer von Tudorache et al. durchgeführten Studie ebenfalls keine signifikante Regurgitation oder strukturelle Degeneration des Transplantats. Die Autoren schlossen hierbei, dass solche Homografts in der klinischen Anwendung vor allem bei jüngeren Patienten mit Kontraindikationen gegen Vitamin-K-Antagonisten berücksichtigt werden sollten [85]. In einer anderen von Tudorache et al. durchgeführten Studie zum Vergleich zwischen dezellularisierten Aortenallografts und pulmonalen Autografts beim Aortenklappenersatz zeigte sich in der Gruppe der pulmonalen Autografts kleine Einsprengungen um den Zellkern herum als ein Zeichen intrinsischer Verkalkung [86].

Kalzifikationen sind also teilweise durchaus noch von Bedeutung in der Nachbeobachtung und der Entwicklung von tissue engineerter Herzklappen. Hierbei ist es von großer Wichtigkeit, die Faktoren, welche zur Entstehung von Kalkablagerungen führen, nachzuvollziehen und zu verstehen. Sanders et al. schrieben 2017, dass durch Scaffoldreste innerhalb der Klappe eine

Immunantwort getriggert werden kann, was eine rasche zelluläre Infiltration zur Folge haben kann [87]. Dies deckt sich mit der chronischen Fremdkörperreaktion, welche immunhistologisch durch die Anwesenheit von Makrophagen in vielen unserer Explantate nachgewiesen wurde. Gleichzeitig bildet eine Immunreaktion einen auslösenden Faktor für eine Gewebedegeneration [88]. Iop et al schlossen 2016, dass eine humorale und zelluläre Immunantwort zu einer Kalzifizierung, Stenosierung und letztendlich einem funktionellen Versagen – zumindest bei allogenen Klappenprothesen – führen kann [89].

Einen weiteren Aspekt in der Entstehung von Kalzifikationen an Herzklappen bilden Risse in der Kollagenstruktur der Segel. Bei Klappenprothesen aus Rinderperikard konnte belegt werden, dass ein mechanischer Stress, der auf die Segel angewandt wird zu einer teilweisen Zerstörung der natürlichen Anordnung von Kollagenfasern innerhalb der Segelstruktur führen kann. Dies kann des weiteren zu einer Kalkablagerung und einem funktionellen Versagen der Klappe führen [77]. Wie in 4.3.1 diskutiert, stellt das Crimping eine erhebliche mechanische Belastung für das Gewebe einer Klappenprothese dar. Während der Implantation des Tiers 60 (dTEHV D.1) und 63 (dTEHV C.2) wurde jeweils eine Katheterkapsel mit einem Innendurchmesser von 8 mm verwendet, dementsprechend wurden die in den Stent eingenähten dTEHV vor Implantation auf 8 mm gecrimpt. Ein definitiver Beweis steht aus, dennoch liegt der Schluss nahe, dass durch das starke Crimping der Klappen C.2 und D.1, verbunden mit verschiedenen immunologischen Faktoren, eine Kalzifikation der Klappensegel begünstigt wurde.

4.3.5 In-vivo Monitoring der Klappenfunktion

Durch die regelmäßige Anwendung einer semiquantitativen und eher qualitativen Methode (ICE) und einer stark quantitativen Methode (MRT) konnten wir den Verlauf der Funktionalität der in unserer Studie implantierten dTEHV detailliert erfassen. Wie bereits dargestellt handelt es sich bei der 2D-Phasenkontrast-MRT um den Goldstandard zur Feststellung und Quantifizierung von Klappeninsuffizienzen. Auch Gottlieb et al. verwendeten die Magnetresonanztomographie, um die Klappenfunktion zu überwachen, und zogen den Schluss, dass die Methode sich für eine solche Fragestellung zu eignen scheint [68]. Der von uns und ebenfalls von Gottlieb et al. verwendete Parameter zur Einschätzung von Klappeninsuffizienzen war die Regurgitationsfraktion. Wald et al. schrieben 2009 jedoch, dass es sich bei der RF um einen hoch variablen Parameter handelt, da er sowohl vom Regurgitationsvolumen selbst, als auch vom rechtsventrikulären Schlagvolumen abhängt. Die Autoren empfahlen, bei der Bewertung einer Pulmonalinsuffizienz eher den sensitiveren Wert des absoluten Regurgitationsvolumens heranzuziehen. Das absolute Regurgitationsvolumen bezeichnet im Gegensatz zur Regurgitationsfraktion nur das Volumen,

welches retrograd durch die Klappe fließt und setzt dieses retrograd fließende Volumen nicht ins Verhältnis zum antegraden Fluss. Gerade bei Patienten mit erheblicher pulmonaler Regurgitation war das Regurgitationsvolumen besser, um eine Dilatation des rechten Ventrikels, und damit einer hämodynamischen Auswirkung dieser Insuffizienz, zu identifizieren [90].

Durch die in zeitlich engen Abständen durchgeführten MRT- und ICE-Untersuchungen, konnten sehr detaillierte Verlaufskurven der Klappenfunktionalität erstellt werden. In dieser zeitlichen Genauigkeit wurden bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe beim in-vivo Monitoring tissue engineerter Herzklappen Follow-up Messungen durchgeführt. Diese Verlaufskurven zeigen einige kritische Punkte in der Entwicklung der Insuffizienzen an. Die mediane RF steigt zwischen Woche 1 (9%) und Woche 36 (13,5%) kontinuierlich an, fällt dann jedoch deutlich ab (Woche 40: 7,5%). Diese Entwicklung deutet darauf hin, dass ein Remodeling-Prozess innerhalb der dTEHV sehr aktiv ist bis 40 Wochen nach Implantation. Zu diesem Ergebnis kamen auch Emmert et al. in ihrer 2018 veröffentlichten Studie über dieselbe Population an tissue engineerter Pulmonalklappen, über die auch in dieser Arbeit berichtet wird: Der Remodelingprozess innerhalb der implantierten dTEHV ist in den ersten sechs Monaten sehr aktiv, die Klappe wird strukturell umgebaut. Danach stellt sich ein Equilibrium ein, sodass die Funktionalität der dTEHV stabil bleibt [67]. Ein ähnlicher Schluss kann aus den Messungen der Koaptationslänge im ICE gezogen werden. Die im ICE gemessene Koaptationslänge der Klappensegel unterschied sich zwischen der Messung direkt nach Implantation und Woche 24 signifikant, jedoch gab es keine signifikante Veränderung dieses Wertes zwischen Woche 24 und Woche 52 (vgl. 3.2.4). Es ist demnach wahrscheinlich, dass in den ersten sechs bis neun Monaten nach Implantation einer dTEHV eine intensive Stoffwechselaktivität – wahrscheinlich im Sinne der Resorption des Scaffoldmaterials und einem Remodeling der EZM und des Endothels der Klappensegel selbst – stattfindet. Hierzu wird im Punkt 4.5 der Diskussion weiter eingegangen.

4.3.6 Methodenvergleich

Zu den Untersuchungen während des 52-wöchigen Follow-ups wurden von uns mit dem ICE eine eher qualitative bzw. semiquantitative Methode und mit dem MRT der Goldstandard zur quantitativen Bestimmung von Klappeninsuffizienzen angewandt. Da die Durchführung von MRT-Untersuchungen teuer und aufwendig ist, erscheint es erstrebenswert, die kostengünstiger und einfacher anwendbare Echokardiographie quantitativ zu validieren.

Insgesamt ist es schwierig, den Vergleich zwischen kardialer MRT und ICE in den wissenschaftlichen Gesamtzusammenhang zu stellen, da die meisten vergleichenden in-vivo

Studien sich auf eine transthorakale oder -ösophageale Echokardiographie (TEE) beziehen [91-94].

Hurtado-Aguilar et al. beschrieben in einer 2016 veröffentlichten Studie, dass sich ein zweidimensionaler Ultraschall durchaus zur Einschätzung einer tissue engineerter Herzklappe *in vitro* eignet. Es wurden tissue engineerter Herzklappen während ihrer Inkubationszeit im Bioreaktor durch eine Ultraschallsonde von außen begutachtet, ohne invasiv in das System einzugreifen. Hierbei wurden 2D Graustufen Aufnahmen, sowie farbkodierte Doppler-Sequenzen aufgezeichnet. Die Autoren schlossen, dass die Möglichkeit Gewebeschrumpfung, Flussprofile und Bewegungsverhalten von Klappensegeln in Echtzeit beurteilen zu können, zu einer Weiterentwicklung tissue engineerter Herzklappen beitragen kann [95]. Die von uns durchgeführte Studie zeigt nun, auf der Basis von Hurtado-Aguilar und Kollegen, dass sich die Nutzung von Ultraschall durchaus auch zur Beurteilung von tissue engineerter Herzklappen *in vivo* eignet. Im Gegensatz zum transthorakalen Ultraschall ist die Pulmonalklappe durch eine intrakardiale Ultraschallsonde problemlos darstellbar. 2008 wurde eine klinische Fallvignette über die perkutane Implantation einer Pulmonalklappe bei einem 26-jährigen Patienten von Chessa et al. veröffentlicht, wobei ICE als Monitoring und Darstellung der Anatomie und Funktionalität genutzt wurde [96]. Aufgrund weiterer Erfahrungen mit der intrakardialen Echokardiographie, der daher wachsenden klinischen Akzeptanz dieser Methode als Orientierungshilfe bei vielen Interventionen [97] und der guten Durchführbarkeit im Schafsmodell entschieden wir uns ebenfalls für die ICE als regelmäßige Kontrolle der Klappenfunktion der von uns implantierten dTEHV. Die Darstellung der dTEHV im longitudinalen Schnitt erwies sich bei uns in den meisten Fällen als problemlos, jedoch konnten aufgrund der Metallstreben des Nitinolstents keine Aufnahmen entsprechender Qualität im Transversalschnitt der Klappe gemacht werden.

Zusätzlich zu den von Lancellotti et al. vorgeschlagenen Kriterien zur Beurteilung von Klappenregurgitationen in der Leitlinie der European Association of Cardiovascular Imaging [60], in der zur Graduierung einer Pulmonalklappeninsuffizienz vor allem die Morphologie der Klappe, die Breite des Regurgitationsjets, ein Rückflusssignal in der Pulmonalarterie, sowie die Stärke des CW-Doppler-Signals der Regurgitation im Vergleich zum Vorwärtsfluss herangezogen werden, wurden in der von uns durchgeführten Studie vor allem auch PISA und VC als Parameter zur Beurteilung auftretender Pulmonalklappeninsuffizienzen angewandt. In den Leitlinien werden proximal isovelocity surface area (PISA) und vena contracta (VC) jedoch vor allem nicht angewandt, da noch keine Studien zur Validierung dieser Methoden vorliegen. Die Mittelwerte der PISA und VC korrelierten in unseren Ergebnissen stark miteinander (Korrelation nach Pearson: 0,789, $p=0,001$). Jedoch ergaben die Berechnungen der Korrelationen nur für die

Mittelwerte der aus der PISA errechneten effektiven Öffnungsfläche der Regurgitation eine mittlere bis hohe Korrelation mit den Werten der RF im MRT, als Goldstandard der Quantifizierung von Klappenregurgitationen (Korrelation nach Pearson: 0,677, $p=0,008$). Bei der Errechnung der ERO wird neben dem PISA-Radius noch die V_{max} aus dem CW-Doppler als weiterer Parameter zur Berechnung herangezogen (siehe 3.2.4.1). PISA-Radius allein und VC ergaben jeweils keine signifikanten Korrelationen zu den Regurgitationsfraktionen der MRT.

Es besteht insgesamt also eine Inkongruenz zwischen den Werten der PISA und VC auf der einen Seite und der quantitativen Bestimmung der RF im MRT. Eine Grundlimitation der von uns angewandten ICE ist vor allem die lediglich zweidimensionale Darstellung der Regurgitationen, bei jedoch einer hemisphärischen Annahme der PISA. Vor allem im Falle von zwei vorliegenden Regurgitationsjets ist die Verwendung der PISA sehr ungenau, schlossen Zurcher et al. [98], wobei die Unterscheidung der Hemisphären der einzelnen Jets in einem solchen Fall oft kompliziert ist. Jamil et al. erklärten in einer 2017 veröffentlichten Arbeit, dass die 2D PISA zumindest bei der Einschätzung und Quantifizierung einer Regurgitation der Mitralklappe deutlich unterlegen gegenüber einer dreidimensionalen PISA-Berechnung bzw. einer 3D-Farbdoppler gestützten Berechnung ist. Diese Methode bezieht sich auf eine zweidimensionale Messung des Radius der isovelocity-Hemisphäre und bietet somit ein deutlich größeres Fehlerpotential [99]. Dieses Fehlerpotential versuchten wir zu minimieren, indem zu jeder Messung ein Mittelwert aus drei verschiedenen Messungen gebildet wurde. Jamil et al. schlugen zur genaueren Quantifizierung jedoch die Anwendung einer dreidimensionalen PISA vor, wobei eine Vielzahl an Datenpunkten in einer isovelocity-Zone im 3D-Ultraschall zur Quantifizierung genutzt werden. Daraus könne ein Mittelwert errechnet werden und eine höhere Präzision ermittelt werden, schreiben die Autoren [99]. Durch die Errechnung von Mittelwerten aus drei aufeinander folgenden Messungen im Gegensatz zur Durchführung einzelner PISA-Messungen, versuchten wir unsere Daten zu validieren und präzisieren, obwohl in unserer Studie kein dreidimensionaler Ultraschall zum Einsatz kam. Durch die höhere Korrelation zwischen ERO und Regurgitationsfraktion im MRT lässt sich ebenfalls schließen, dass durch die Verwendung zweier in der ICE gemessenen Parameter die quantitative Genauigkeit dieser Methode verbessern lässt.

Als einen Parameter der Echokardiographie, welcher mit der pulmonalen RF in der MRT korreliert, fanden Mercer-Rosa et al. 2012, dass das Verhältnis des ante- und retrograden DSTVI (diastolic-systolic-time-velocity-integral) mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,6 ($p < 0,0001$) bei Patienten mit einer Fallot'schen Tetralogie moderat miteinander korreliert. Jedoch wurde das DSTVI nicht über verschiedene Messzeitpunkte hinweg longitudinal bestimmt. Die Aussagekraft auf eine Follow-up Studie wie in dieser Arbeit zu übertragen ist daher nur bedingt

möglich. Die Autoren schlossen vor allem, dass das DSTVI-Verhältnis ein zusätzlicher Parameter zur quantitativen Beurteilung einer Pulmonalklappeninsuffizienz sein kann. Eine genaue Validierung des DSTVI sollte jedoch erfolgen, da ihre Daten lediglich in einer Querschnittsstudie erhoben wurden [93]. Ein weiterer Parameter, welcher zur Einschätzung von Pulmonalinsuffizienzen herangezogen werden könnte, ist der von Festa et al. vorgeschlagene PRIME (Pulmonary Regurgitation Index in der M-Mode Echokardiographie) [92]. Dieser Index stellt die Schwankung des Durchmessers der rechten Pulmonalarterie, zwischen Systole und Diastole dar. In dieser Studie wird der PRIME ebenfalls lediglich als zusätzliches Werkzeug zur Beurteilung von Klappeninsuffizienzen bei einer Fallot'sches Tetralogie angesehen, jedoch nicht als tragfähige Alternative zum MRT. Einen ähnlichen Schluss zogen auch Zdradzinski et al. in einer 2015 veröffentlichten Arbeit [91].

Im Gegensatz dazu schlossen Grothoff et al. sogar, dass die echokardiographische Einschätzung von Pulmonalklappeninsuffizienzen nach chirurgischer Korrektur einer Fallot'sches Tetralogie als kostengünstiges, einfach durchführbares und vor allem verlässliches Mittel in der Nachbeobachtung solcher Patienten dienen kann. Hierbei wurden jedoch lediglich die semiquantitativen Graduierungen einer Insuffizienz mit entsprechenden Regurgitationsfraktionen in der MRT verknüpft⁸. Quantitative Werte aus Echo und MRT wurden nicht miteinander verglichen [94].

In der Analyse bezüglich Korrelationen zwischen MRT und ICE konnten in den von uns angefertigten Daten keine hohen Korrelationen festgestellt werden. Lediglich die effective region of orifice (ERO) ermittelt aus der PISA korrelierte mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,68 ($p=0,0008$) mit der in der MRT ermittelten RF. Gerade bei den in der intrakardialen Echokardiographie erhobenen quantitativen Daten besteht ein großes Fehlerpotential. Beispielhaft kann hierfür die gemessene Koaptationslänge der Klappensegel dienen. Um eine realistische Aufzeichnung der Koaptation zu erreichen, muss die Bildebene des Echos komplett parallel zu den seitlichen Stentstreben stehen. Da dies jedoch nicht immer zweifelsfrei möglich ist, ergeben sich teilweise überschätzte Werte der Koaptationslänge, indem die Bildebene parallel zu den Kommissuren der Klappensegel dargestellt wird. Insgesamt festigt sich der Eindruck der aktuellen

⁸ Die echokardiographische Graduierung in der von Grothoff et al. durchgeführten Studie erfolgte kurz gefasst nach folgendem Schema: Grad I – Inuffizienzjet kleiner als ein Drittel des RVOT. Grad II – Inuffizienzjet zwischen einem und zwei Dritteln des RVOT. Grad III – Inuffizienzjet größer als zwei Drittel des RVOT.

Literatur, dass echokardiographisch keine eindeutige Quantifizierung von Klappenregurgitationen, vergleichbar zur MRT, möglich ist.

Dennoch bietet die ICE als qualitative Methode zusätzlich zur MRT eine gute Aufzeichnungsmöglichkeit qualitativer Eigenschaften der Herzklappen, wie etwa die Lokalisation und Signalstärke der Insuffizienzjets, sowie Bewegungsprofile der Klappensegel.

4.3.7 Andere experimentelle Ansätze zum Herzklappenersatz

Neben dem Konzept des klassischen Tissue Engineerings auf synthetischen, bioresorbierbaren Scaffolds gibt es weitere Möglichkeiten, Herzklappen zu entwickeln, um ihre Funktionalität auf lange Sicht zu verbessern und die Limitationen der herkömmlichen aktuell verwendeten Klappenprothesen (mechanische und mit Glutaraldehyd fixierte biologische Herzklappen) zu überwinden. Hierzu zählen etwa dezellularisierte Xenografts, dezellularisierte oder kryokonservierte homografts, dezellularisierte Allografts, sowie allogene bioengineerte Herzklappen.

Bereits 2006 erforschten Takagi et al., ob dezellularisierte Xenografts in-vivo von körpereigenen Zellen rebesiedelt werden können. Hierzu wurden Aortenklappenkonduits von Hasen in die abdominale Aorta von Hunden implantiert und nach 4, 12 bzw. 24 Wochen explantiert. Die Ergebnisse zeigten eine Rezellularisierung mit vaskulären Zellen ohne immunologische Reaktionen gegen das Konduit [100].

In einer 2017 veröffentlichten Studie beschrieben Hennessy et al. die Implantation von dezellularisierten Schweine-Aortenklappen in den RVOT von fünf juvenilen Schafen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die dezellularisierten porcinen Aortenklappen ihre Gewebeintegrität während der Implantation und der anschließenden fünfmonatigen Nachbeobachtungszeit beibehielten und eine Rebesiedelung mit ovinen Zellen ermöglichten. Hennessy et al. schlossen aus ihren Versuchen auf die Durchführbarkeit einer trans-Spezies-Implantation nicht-fixierter dezellularisierter Klappenprothesen und deren potenzielle Anwendung solcher Herzklappenprothesen beim Menschen [101]. Ergebnisse, die eine Funktionalität solcher Klappen über einen Zeitraum von zwölf Monaten – wie in der von uns durchgeführten Studie – liegen jedoch noch nicht vor. Zudem scheint die Applikation eines solchen Modells (also eine trans-Spezies-Implantation von porcinen TEHV in den Menschen) aufgrund des Epitops α -Gal, welches in Schweinegewebe ausgebildet wird und dem anti-Gal Antikörper, der von allen Primaten gebildet wird.

Eine vielversprechende Alternative zu mechanischen oder Glutaraldehyd-quervernetzten Herzklappenprothesen bieten kryokonservierte bzw. dezellularisierte Homografts oder Allografts.

Dezellularisierte aortale Allografts zeigten im Großtiermodell bei juvenilen Schafen bereits das Potenzial des Mitwachsens und der Rezellularisierung, sowie eine adäquate hämodynamische Funktionalität über einen Zeitraum von 20 Monaten [86]. Auch bei älteren Schafen konnte im in-vivo Experiment die Fähigkeit der Rebesiedelung von dezellularisierten pulmonalen Allografts beim orthotopen Klappenersatz nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich vor allem kein Vorteil einer in-vitro Rezellularisierung mit Zellen des Empfängerorganismus vor Implantation, was für die Autoren die Tauglichkeit solcher biologischen Matrizen zur in-vivo Re-Endothelialisierung beim Herzklappenersatz weiter bestätigte. Allerdings war bei vier Tieren ein deutlicher Anstieg der Insuffizienz bis zum Zeitpunkt der Euthanasierung zu verzeichnen, wobei jedoch keine Insuffizienz höher als moderat einzustufen war [102].

Im klinischen Einsatz konnten Sarikouch et al. beim Vergleich zwischen dezellularisierten pulmonalen Homografts (DPH) und herkömmlichen kryokonservierten Homografts, bzw. Rinderjugularvenenklappen eine gute Funktionalität solcher DPH nachweisen. Während einer Nachbeobachtungszeit von ca. 4 ½ Jahren konnte sogar ein reduzierter Anteil an Re-Operationen in der Gruppe der DPH im Vergleich zu herkömmlichen kryokonservierten Homografts und Rinderjugularvenenklappen beobachtet werden. Vor allem bei jüngeren Patienten degenerierten die bovinen Grafts schneller, was zur Notwendigkeit eines erneuten Klappenersatzes führte. Selbst 10 Jahre nach Implantation, waren die dezellularisierten pulmonalen Homografts zu 100% frei von einer Re-Operation und scheinen damit eine praktikable Alternative zu bovinen Jugularvenenklappen oder kryokonservierten Homografts zu bieten [103]. Zu diesem Schluss kamen auch Neumann et al. in einem 2013 veröffentlichten Review zu dezellularisierten Allograft-Matrizen in der klinischen Anwendung [104].

Iop et al. präsentierten 2014 die Funktionalität von dezellularisierten porcinen Aortenklappen, die in den RVOT von Schweinen implantiert wurden über einen Zeitraum von 15 Monaten. Hierbei zeigten die implantierten Klappen eine adäquate Hämodynamik und eine zunehmende Repopularisierung während der Monate der Nachbeobachtung [105].

In der präklinischen Situation untersuchten Iop et al. 2017 die Einflüsse einer Dezellularisierung und anschließenden Kryokonservierung bei menschlichen Aortenklappen auf die Struktur der extrazellulären Matrix. Es konnte gezeigt werden, dass die EZM eine große Ähnlichkeit mit frischem Aortenklappengewebe aufwies und durch die in-vitro Bearbeitung nicht wesentlich verändert wurde [89]. Solche dezellularisierten Klappen bergen nach Meinung der Autoren keinerlei immunogenes Potenzial, können durch die Kryokonservierung als off-the-shelf-Alternative zu herkömmlichen Klappenprothesen dienen und bieten ebenso die Möglichkeit der Regeneration und des Wachstums.

Ebenfalls mit dezellularisierten pulmonalen Allografts arbeiteten Quinn et al., die die von ihnen getesteten Klappen jedoch vor Implantation zusätzlich in einer Salz-/Mannitol-Lösung und einer Hyaluronin-Lösung aufbereitet – bioengineert – wurden um die Struktur der EZM zu stärken und zusätzlich als natürlicher Weichmacher zu fungieren. In der 6-monatigen Nachbeobachtungszeit fiel auf, dass die allogenen bioengineerten Pulmonalklappen gegenüber der rein kryokonservierten Kontrollgruppe eine größere Koaptationszone behielten und insgesamt nativen Herzklappen ähnlicher waren [106].

Insgesamt zeigen dezellularisierte allogene Herzkappenprothesen im in-vitro und im präklinischen in-vivo Modell sowie in klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse und können durchaus eine mögliche Alternative zu herkömmlichen Klappenprothesen darstellen. Limitierender Faktor bei solchen Allo- oder Homografts ist jedoch die Abhängigkeit von Spenderorganen, die nicht in großer Zahl vorhanden sind und sich daher nicht dem immensen Herzklappenbedarf gerecht werden können. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass es noch keine wirklichen Langzeiterfahrungen mit dezellularisierten Klappenprothesen gibt. Helder et al. untersuchten in einer retrospektiven Analyse von Patientendaten den mittel- bis langfristigen Erfolg dezellularisierter Aortenklappen-Allografts (DAVA) gegenüber kryokonservierten Allografts [107]. Im Gegensatz zu Sarikouch et al. [103] bemerkten sie eine signifikant erhöhte Rate an Reoperationen in der DAVA-Gruppe (51% frei von Reoperationen nach 10 Jahren in der DAVA-Gruppe, gegenüber 80% in der Gruppe der kryokonservierten Allografts). Vielversprechende Ergebnisse der initialen und mittelfristigen Funktionalität sind daher noch kritisch zu betrachten.

4.4 Vergleich zur ersten Generation

Die von Schmitt et al. durchgeführten transvenösen Implantationen einer ersten Generation von dTEHV zeigten die Machbarkeit eines solchen Versuches. Die in den Nitinolstent eingenähten dTE-Klappen konnten entsprechend der Anforderungen an die Implantationen gecrimpt werden, sodass die Ergebnisse hierbei von einem jugularen Zugang beim Schaf auf einen femoralen Zugang beim Menschen durchaus übertragbar sind, was die Größenverhältnisse betrifft. Es zeigte sich eine vollständige Endothelialisierung der Klappensegel und Graftwand mit Zellen des Empfängerorganismus spätestens 16 Wochen nach Implantation. Die Öffnungsfunktion der Klappensegel war exzellent, es wurden keine erhöhten Druckgradienten oder Flussgeschwindigkeiten festgestellt. Allerdings entwickelten diese dTEHV progressive zentrale Insuffizienzen. Acht Wochen nach Implantation zeigten alle Schafe eine moderate bis schwere pulmonale Insuffizienz im ICE. 24 Wochen nach Implantation zeigten sogar 80% der sich noch im Versuch befindenden Tiere eine schwere Insuffizienz und 20% eine moderate Insuffizienz. Als

Ursache für diese schwerwiegenden zentralen Insuffizienzen wurde eine Verkürzung der Klappensegel ausgemacht, die auf einer Fusion zwischen Segel und Graftwand, sowie der aktiven Retraktion der Segel selbst beruhte. Der Mechanismus des funktionellen Versagens dieser Klappengeneration wurde wie folgt hergeleitet: Aufgrund der suboptimalen Geometrie dieser dTEHV kam es zu einer nicht-physiologischen und vor allem verringerten radialen Dehnbelastung der Klappensegel während der Diastole, sowie einem verringerten Auswaschen von Zellen und Blut aus den Sinus der Klappensegel. Die fehlende Belastung führte dann zur Zell-vermittelten Segelverkürzung über α -SMA positive Zellen auf der Oberfläche der Klappentaschen, sowie zur Fusion zwischen Segel und Wand durch ein vermindertes Auswaschen von Zellen im Sinus. Schmitt et al. stellten zudem fest, dass ein Zusammenhang zwischen der Ovalität des Stents und dem Insuffizienzgrad der implantierten Klappe besteht [55].

Aufgrund dieser Erfahrungen im Großtiermodell wurde aufgrund von Computersimulationen eine neuartige Geometrie entworfen, welche im in-vivo Experiment über einen längeren Zeitraum funktionsfähig blieb [56].

Grundlegend kann gesagt werden, dass die Optimierung der Geometrie dieser dTEHV ein Aufrechterhalten der Klappenfunktion über 52 Wochen hinweg ermöglichte. Der direkte Vergleich der dTEHV der ersten und zweiten Generation kann vor allem im Hinblick auf die Ergebnisse des ICE und des Explantationsbefundes gestellt werden. Kardiale MRT wurden zur Untersuchung der Funktionalität der ersten Generation von Schmitt et al. noch nicht durchgeführt. Im ICE direkt nach Implantation zeigten in der ersten Generation von 14 implantierten dTEHV 4 keine, 4 eine milde, 4 eine moderate und 2 Tiere eine schwere Insuffizienz. Zum gleichen Zeitpunkt zeigten von den 15 implantierten dTEHV der zweiten Generation 10 Klappen keine, 2 eine milde und 3 eine moderate Insuffizienz. Keine der 15 implantierten Klappen wies eine schwere Insuffizienz auf. Nimmt man in der zweiten Generation die dTEHV1.1 der ersten Produktionsreihe aus der Auswertung heraus (wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, wurde das Protokoll der Klappenherstellung im Bioreaktor nach den anfänglichen Erfahrungen mit beschädigten Klappensegeln während der Implantation angepasst), so hatten 80% der dTEHV2.0 direkt nach Implantation keine und 20% lediglich eine milde Insuffizienz. Die initiale Funktionalität bezüglich des Klappenschlusses zeigt sich demnach als deutlich verbessert gegenüber der ersten Generation. Nach 24 Wochen präsentierten sich die Klappen der ersten Generation zu 80% mit einer schweren, zu 20% mit einer moderaten Insuffizienz. In der zweiten Generation fanden sich bei den 5 zu diesem Zeitpunkt beobachteten Klappen folgende Insuffizienzgrade: 2 mild, 2 moderat, 1 schwer. Die enorme Verbesserung der Funktionalität fällt vor allem aber beim Betrachten des Endpunktes der von uns durchgeführten Studie auf. Hier

erwiesen sich von neun noch im Versuch befindlichen dTEHV eine ohne Insuffizienz, sechs mit lediglich milder und nur zwei Klappen mit moderater Insuffizienz in der ICE.

Einen Grund für die verbesserte Funktionalität kann die deutlich größere Koaptationszone darstellen. In der von uns durchgeführten Studie der verbesserten Geometrie war zu jedem Zeitpunkt eine Koaptation der Klappensegel vorhanden und lediglich ein zentrales Koaptationsdefizit vorhanden. Die Koaptationszone veränderte sich zwar im Laufe der Nachbeobachtungszeit, blieb ab 24 Wochen nach Implantation jedoch bei etwa 2,8 mm – 3 mm stabil (Tabelle 18). Die dTEHV der ersten Generation wiesen im Verlauf der Studie ein komplettes Koaptationsdefizit auf, teils sogar mit einem Prolaps der Klappensegel in den RVOT. Der Zusammenhang zwischen Insuffizienzgrad im ICE und der Stenotomie war bei den dTEHV mit optimierter Geometrie nicht vorhanden. Vermutlich ist der Einfluss der Ovalität auf den suffizienten Schluss der Klappensegel bei einer ausreichenden Koaptation der Klappensegel nicht mehr so bedeutsam.

Einer der Mechanismen, die zur Segelverkürzung in der Studie von Schmitt et al. [55] führten, war die zellvermittelte Segelretraktion durch α -SMA positive Zellen. In der histologischen Auswertung der von uns implantierten Klappen zeigten sich ebenfalls α -SMA positive Zellen auf den Klappensegeln und der Graftwand. Bei Syedain et al., die eine tissue engineerter Herzklappe in Aortenposition implantierten und nach 24 Wochen wieder explantierten, zeigten sich nach zwölf Wochen teilweise in der Hinge-Region und nach 24 Wochen im Bereich des freien Endes der Segel auch α -SMA positive Zellen [81]. Reimer et al. beobachteten zwar ebenfalls eine Verkürzung der Klappensegel nach der chirurgischen Implantation tissue engineerter Pulmonalklappen, jedoch wiesen die Explantate keine wesentliche Besiedelung mit α -SMA positiven Zellen auf. Die Segelverkürzung wurde eher einer Instabilität der Kommissuren zugeschrieben [12].

Zwar wurden in den in unserer Studie durchgeführten histologischen Aufarbeitungen der Explantate durchaus noch α -SMA positive Zellen im Endothel gefunden, jedoch schienen diese nicht bei allen Klappen eine Retraktion der Klappensegel hervor zu rufen. Hierbei spielt wohl vor allem die Lenkung des Remodelingprozesses eine Rolle, auf die in Punkt 4.5 der Diskussion weiter eingegangen wird. Ähnlicherweise wurden von Iop et al. auf dezellularisierten Aortenklappen, welche allotransplantiert wurden, nach Explantation auch α -SMA positive myoendotheliale Progenitorzellen bei adäquater hämodynamischer Funktion nachgewiesen [105]. Insgesamt kann also angenommen werden, dass die Anpassung der Geometrie der dTEHV zu einer deutlich verbesserten Funktionalität dieser Klappen führte. Der aktiven zellvermittelten

Segelverkürzung und der Fusion zwischen Klappensegel und Graftwand konnte Einhalt geboten werden. Die bauchigere Form der Klappentaschen führte zu einer physiologischeren Belastung der Segel und einer größeren Koaptationsfläche zwischen den Segeln. Die Mechanismen, die zum funktionellen Versagen der dTEHV der ersten Generation führten, konnten also weitgehend aufgehoben werden.

| | | dTEHV 1 | dTEHV 2 | p-Wert (Wilcoxon-Test) |
|----------|------------------------|-------------|-------------|------------------------|
| Woche 0 | Insuffizienzgrad | 1,47 ± 0,26 | 0,2 ± 0,13 | 0,003* |
| | Koaptationslänge in mm | 0,56 ± 0,30 | 7,05 ± 0,92 | 0,000* |
| Woche 24 | Insuffizienzgrad | 2,80 ± 0,2 | 1,80 ± 0,37 | 0,095 |
| | Koaptationslänge in mm | 0,00 ± 0,00 | 3,00 ± 0,71 | 0,005* |
| Woche 52 | Insuffizienzgrad | n.a. | 1,06 ± 0,16 | n.a. |
| | Koaptationslänge in mm | n.a. | 2,81 ± 0,39 | n.a. |

Tabelle 18: Vergleich zwischen dTEHV 1 und dTEHV 2.

Der Insuffizienzgrad direkt nach Implantation war signifikant niedriger in der zweiten Generation dTEHV ($p = 0,003$). Die Koaptationslänge unterschied sich an den verglichenen Messzeitpunkten direkt nach Implantation und nach 24 Wochen ebenfalls signifikant.

4.5 Remodelingprozess

Bei der Betrachtung der Funktionalität der von uns implantierten dTEHV können trotz der insgesamt gegenüber der ersten Generation verbesserten Funktionalität grundsätzlich zwei Entwicklungen erkannt werden. Klappen mit einer relativ gesehen guten und einer relativ gesehen schlechten Funktionalität bezüglich des funktionellen Ergebnisses 52 Wochen nach Implantation. Als Unterscheidungskriterium hierzu dient der Median der RF im MRT. Vier Klappen (B.2, C.2, D.2, D.3) liegen 52 Wochen nach Implantation deutlich unter dem Median, 3 Klappen (E.1, E.3, E.4) deutlich darüber. Zur Gruppe der schlechter funktionierenden Klappen soll ebenso die dTEHV B.1 gezählt werden, da hier schon nach 24 Wochen das primäre Abbruchkriterium erfüllt wurde.

Zumindest echokardiographisch wiesen alle implantierten Klappen direkt nach Implantation eine optimale Funktionalität auf (Insuffizienzgrad 0-1 nach Lancellotti et al. [60]). Lediglich bei Klappe B.2 und C.2 konnte eine leichte Insuffizienz beobachtet werden, die sich in der MRT jedoch nicht im Sinne einer erhöhten RF zeigte. Im Verlauf ging die Funktionalität der Klappen dann jedoch weit auseinander, der einsetzende Remodelingprozess schien sich bei den

implantierten dTEHV in unterschiedliche Richtungen zu entwickeln. Ein makroskopisches Korrelat dieses fehlgeleiteten Remodelingprozesses bildet vor allem die Differenz zwischen der Tiefe der Klappentaschen bei Implantation und Explantation. Im Mittel verringerte sich diese Tiefe bei den „schlechten“ Klappen um $3,13 \pm 0,87$ mm, gegenüber $1,06 \pm 0,48$ mm bei den gut funktionierenden Klappen. Ebenso stellte sich bei der makroskopischen Begutachtung der Klappen dar, dass sich bei 3 der 4 gut funktionierenden Klappen ein Nodulus, sowie eine Lunula am oberen Segelrand bildeten und somit der Anatomie einer nativen Pulmonalklappe sehr nah waren. Die zentralen Bereiche der Klappe konnten somit durch den Nodulus gut abgedichtet werden. Die dTEHV der „schlechten“ Gruppe präsentierten sich in der makroskopischen Begutachtung im Gegensatz dazu ohne einen Nodulus und einer festen und rigide wirkenden Lunula. Diese Ergebnisse werfen die Frage nach Gründen für die unterschiedliche Entwicklung des Remodelings bei den implantierten dTEHV auf.

Grundsätzlich stammen die Klappen der schlechteren Funktionalität aus der letzten Produktionsreihe (Insert erst nach 13 Tagen Kultivierung im Bioreaktor), die Ausnahme bildet dabei dTEHV B.1 (Insert von Beginn an im Bioreaktor). dTEHV B.1 präsentierte sich jedoch mit einer sehr inhomogenen Gewebestruktur der Klappensegel.

Makroskopisch auffällig war, dass die Klappen aus der letzten Produktionsreihe E sehr dicke und dicke Klappensegel vor Implantation aufwiesen (Abbildung 28). In der Produktionsreihe B wurde der Insert von Beginn an dem Bioreaktor beigelegt, im Inkubationsmedium lag eine 0,1%ige Lammserumkonzentration vor. In der Produktionsreihe C wurde der Insert ebenfalls von Beginn der Inkubation an dem Bioreaktor beigelegt, jedoch lag eine 0,5%ige Lammserumkonzentration im Inkubationsmedium vor. In der Produktionsreihe E wurde der Insert erst nach 13 Tagen Inkubationszeit der TEHV beigegeben, die Konzentration des Lammserums im Inkubationsmedium betrug 1%.

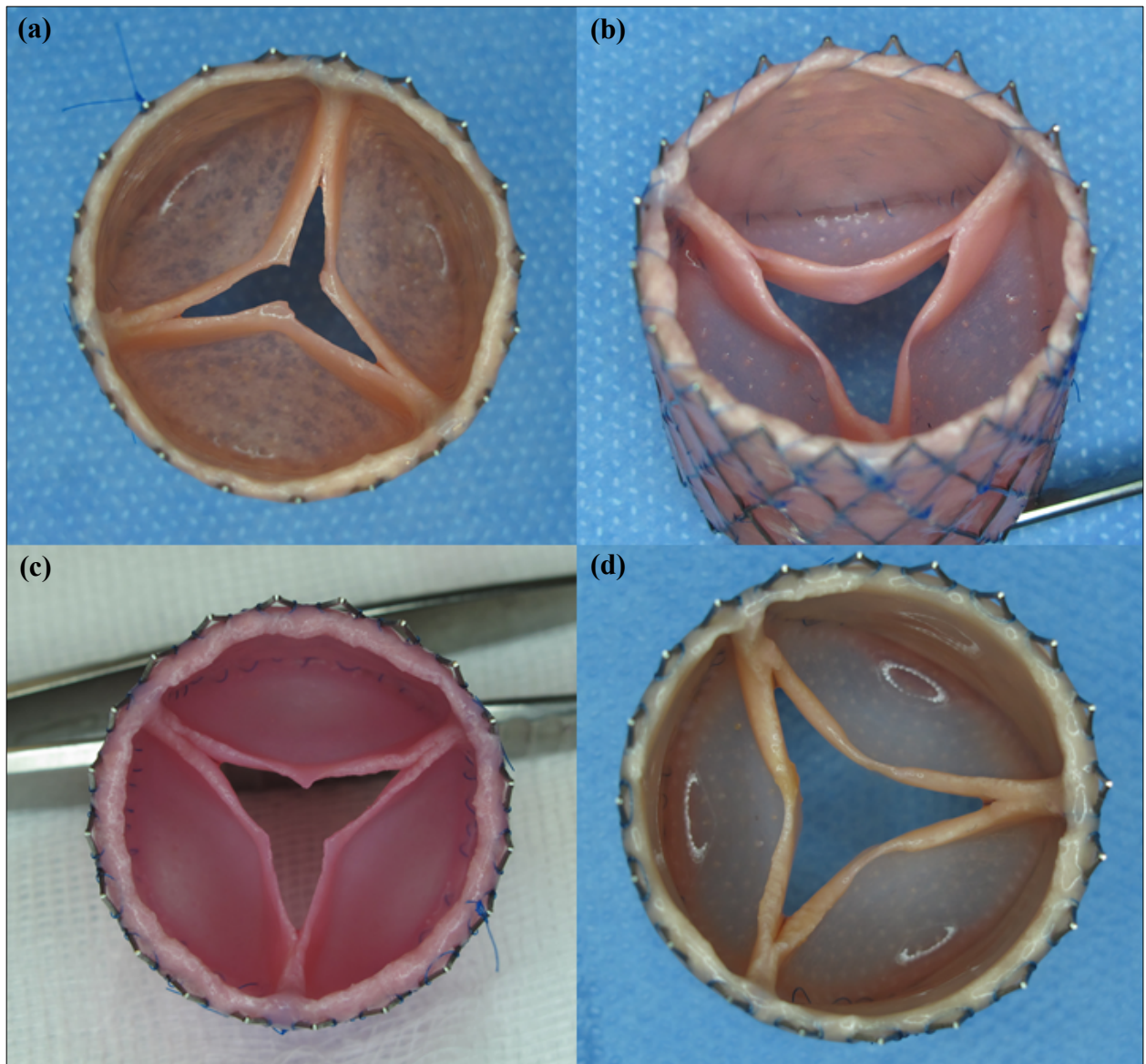


Abbildung 28: Makroskopischer Vergleich der verschiedenen dTEHV vor Implantation.

(a) dTEHV B.1. (b) dTEHV B.2. (c) dTEHV E.3. (d) dTEHV C.2. Die Gewebestruktur der Klappe B.1 erscheint verglichen mit der Struktur der Klappe B.2 aus der gleichen Produktionsreihe relativ inhomogen. Es sind einzelne Faserzüge makroskopisch zu erkennen. Bei dTEHV E.3 erscheint die Gewebeformation der Klappentaschen sehr dicht und fest.

Loerakker et al. [108] beschrieben in ihrer Arbeit 2013 die Bedeutung der radialen Zug- oder Dehnbelastung der Klappensegel für einen gerichteten Remodelingprozess. In Computersimulationen ließ sich mit der geringeren Druckbelastung im pulmonalen System mit den hierbei getesteten Klappengeometrien jedoch nur eine sehr geringe Zugbelastung in radialer Ausrichtung auf die Klappensegel feststellen, die Konsequenz war ein fehlgeleitetes Remodeling in anschließenden in-vivo Versuchen mit Klappen desselben Designs [53, 55]. Sanders et al. [56] entwickelten im Rahmen dieses Projektes in der Folge mithilfe von computational fluid dynamics

(CFD) Simulationen eine neuartige Geometrie für die zu implantierenden Herzklappen (Abbildung 29).

Anhand dieser Simulationen konnten verschiedene Geometrien und deren Auswirkung auf die radiale Dehnbelastung der Klappensegel errechnet und in der Folge eine Vorhersage über die Funktionalität der Herzklappen getroffen werden.

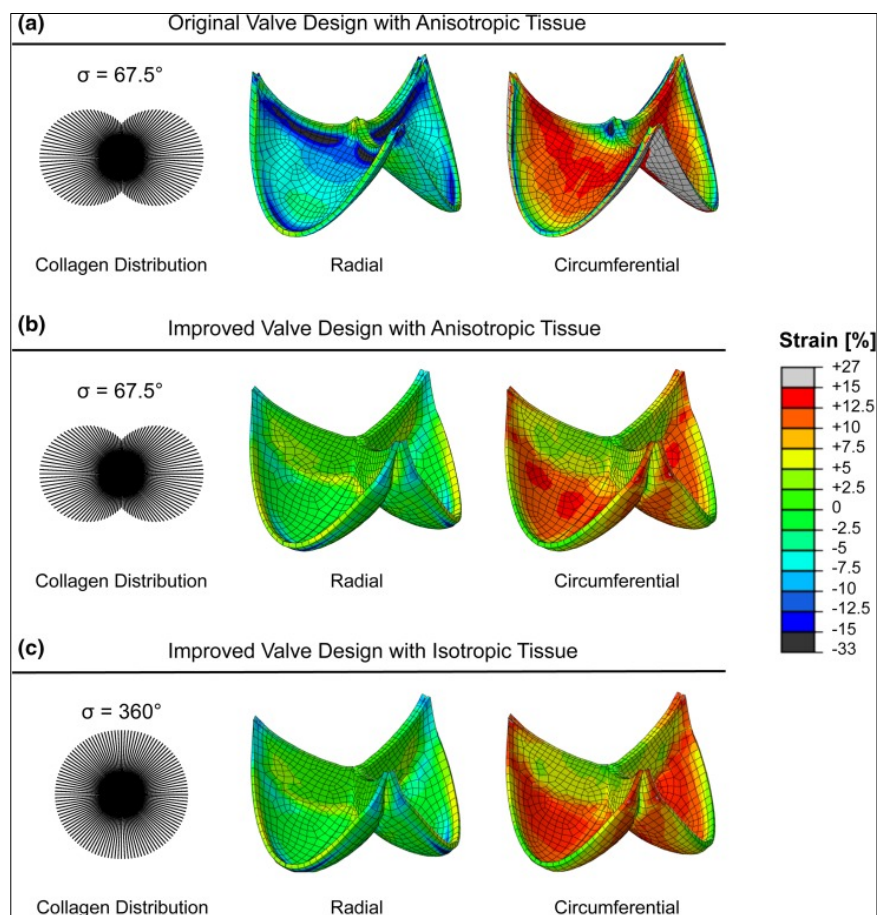


Abbildung 29: CFD-Simulationen unserer Konsortialpartner der technischen Universität Eindhoven.

Dargestellt sind die drei verschiedenen Klappengeometrien und deren Auswirkung auf die radiale Dehnbelastung (Strain). (a) In den dTEHV1.0 verwendete Geometrie. (b) + (c) Geometrie der dTEHV, die in dieser Arbeit getestet wurden. Untersucht wurde zusätzlich, wie sich die Verteilung der Kollagenfasern innerhalb der Klappe – also die Anisotropie der Klappenstruktur – auf den Strain auswirkt. Diese Abbildung stammt aus Sanders et al.: Improved Geometry of Decellularized Tissue Engineered Heart Valves to Prevent Leaflet Retraction [56].

Durch die bauchigere Segelform und eine höhere Koaptationszone am Segelrand zeigten die Simulationen eine insgesamt deutlich höhere radiale Dehnbelastung während der Diastole. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die Ausbildung einer Zugbelastung in radialer Richtung mit der neuen Geometrie auch schon unter Druckverhältnissen, die im pulmonalen

Kreislauf vorherrschen, vorhanden ist. Die radiale Belastung war in den von Loerakker et al. durchgeführten Simulationen neben der Geometrie auch abhängig vom Grad der Anisotropie der Kollagenfasern der Klappensegel und der Gewebestärke des Gewebes. So wurden mit einem hohen Grad der Anisotropie innerhalb der Klappensegel höhere radiale Dehnungen der Segel gemessen, als mit einer niedrigeren Anisotropie. Ebenso hängt die Dehnung auch von der Breite der Koaptationszone am oberen Segelrand ab.

Insgesamt bestätigte sich die Vorhersage von Sanders et al., dass mit der neuen Geometrie aufgrund der höheren radialen Belastung der Klappensegel die dTEHV weniger anfällig gegenüber einer zellvermittelten Retraktion der Segel, bzw. einer Fusion zwischen Segel und Graftwand sind. Als Ursache für das fehlgeleitete Remodeling der „schlechten“ Klappen der zweiten Generation kommen wieder Unterschiede in der mechanischen Belastung der Klappensegel in Betracht. Aufgrund des späten Beigebens des Inserts in den Bioreaktor bei der letzten Produktionsreihe der dTEHV E.1, E.3 und E.4 konnte wesentlich mehr Gewebe gebildet werden, wodurch die Klappen vor Implantation makroskopisch dickere Segel aufwiesen. Eine genaue Quantifizierung der Gewebemasse innerhalb der Segel liegt jedoch nicht vor. Aufgrund der größeren Menge an Gewebe liegt der Schluss nahe, dass die mechanische Zugbelastung auf die Klappensegel während der Diastole, verglichen mit den anderen Produktionsreihen der Klappen, nicht so hoch war. Bezüglich der Klappe B.1 kann gefolgert werden, dass aufgrund der inhomogenen Struktur der Klappensegel ein signifikant niedriger Grad an Anisotropie innerhalb des Segels herrschte und folglich auch die radiale Dehnung der Segel weniger stark ausgeprägt war, bei vergleichbaren pulmonalarteriellen Druckverhältnissen. Infolge dieser wahrscheinlichen Verminderung der radialen Zugbelastung der Klappensegel in den Klappen B1, E.1, E.3 und E.4 wurde der Remodeling-Prozess vermutlich in eine andere Richtung geleitet als bei den restlichen implantierten Klappen, mit einer stärkeren Verminderung der Hinge-Region, als Ausdruck des Gewebeabbaus aufgrund der niedrigeren Beanspruchung. Die Folge war eine Rückbildung und Verkleinerung der Hinge-Region und eine dementsprechende Erhöhung der Insuffizienz.

Interessanterweise nahm der diastolische pulmonalarterielle Druck zwischen den Druckmessungen direkt nach Implantation bis direkt vor Explantation bei den gut funktionierenden dTEHV um 1 mmHg im Mittel zu, wohingegen dieser Druck bei den schlecht funktionierenden Klappen um 3 mmHg im Mittel abnahm. Aufgrund der kleinen Fallzahl und auch nur marginalen Veränderungen ist dieser Befund zwar nicht signifikant, jedoch könnte diese Tendenz durch die von Loerakker et al. sowie Sanders et al. beschriebenen Ergebnissen gestützt werden. Durch einen höheren diastolischen Druck erfahren die Klappensegel eine höhere Dehnbelastung, wodurch ein gut geleiteter Remodeling-Prozess induziert werden kann.

Dementsprechend könnte der leicht steigende diastolische pulmonalarterielle Druck das Remodeling der funktionell guten dTEHV positiv beeinflusst haben. Über dies hinaus sollte erwähnt werden, dass sich sowohl die Simulationen von Sanders et al. als auch Loerakker et al. sich auf diastolische Drücke von 15 mmHg im pulmonalen System bezogen. In unserem Tierexperiment wurden jedoch deutlich niedrigere Drücke gemessen (diastolischer Druck in der Pulmonalarterie: vor Implantation 9 ± 5 mmHg, nach Implantation 9 ± 4 mmHg, vor Explantation 8 ± 3 mmHg; $n = 10$). Dies könnte durchaus eine weitere Erklärung für ein teilweise fehlgeleitetes Remodeling darstellen, trotz der Computersimulationen, die eine adäquate Dehnbelastung der Klappensegel vorhersagten.

Es lassen sich also drei Faktoren benennen, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Klappenfunktion haben: der diastolische pulmonalarterielle Druck, die insgesamt Gewebemenge der Klappensegel, sowie die Homogenität des Gewebes. Diese Faktoren liegen vor allem in der Herstellungsweise der dTEHV, sodass eine Standardisierung der Produktion tissue engineerter Herzklappen nötig ist. Vor allem schien die Produktionsreihe, bei der der formgebende Insert 10 Tage nach Kultivierungsbeginn zum Bioreaktor hinzugegeben wurde, mit einer Serumkonzentration von 1,0 % Lammserum im Inkubationsmedium (Gruppe D) eine sehr gute Funktionalität zu bieten, sodass dieses Protokoll vielversprechend erscheint. Auf dieser Grundlage könnten beispielsweise zukünftige tierexperimentelle Studien geplant werden. Darüber hinaus sollte der diastolische Druck im Lungenkreislauf nicht zu niedrig ausfallen.

4.6 Limitationen

Die Ergebnisse dieser Studie sind in ihrer Gesamtheit nur bedingt aussagekräftig für eine mögliche Implantation tissue engineerter Herzklappen beim Menschen. Vor allem durch die geringe Fallzahl (15 geglückte Implantationen, 10 dTEHV2.0 im funktionellen Follow-up) und die zusätzlich noch verschiedenen Produktionsreihen der Klappen ist eine definitive Vergleichbarkeit der getesteten Herzklappen insgesamt schwierig. Darüber hinaus besaßen die zur Implantation herangezogenen Schafe eine normale Anatomie des kardiopulmonalen Systems. Bei pädiatrischen Patienten mit etwaigen angeborenen Herzfehlern wäre der Implantationsmechanismus durch die veränderte Anatomie deutlich erschwert. Zusätzlich wurden in der von uns durchgeführten Studie keine größenadaptierten Stents, sondern Einheitsgrößen verwendet. Bei manchen Tieren wurde daher nach Implantation der Anulus der Pulmonalarterie sowie der RVOT deutlich stärker durch die Radialkraft des Stents gedehnt als bei anderen Tieren. Der Einsatz an Patienten würde den Einsatz größenadaptierter Klappen und Stents notwendig machen. Ebenso wurde ein nicht-resorbierbarer Metallstent in unserer Studie verwendet. Dieser würde im Körper des Empfängers verbleiben und

bietet keine Möglichkeit mitzuwachsen. Für zukünftige Implantationen und Studien mit längerer Nachbeobachtungszeit wäre es vorteilhaft, die dTEHV in einem bioresorbierbaren Stent zu implantieren und Wachstum der Klappe und der umliegenden Strukturen zu ermöglichen.

Eine weitere Limitation dieser Studie ist, dass der Einfluss des Crimpings auf die Klappenfunktionalität nie strukturiert getestet wurde. Manche Klappen wurden vor Implantation im Rahmen des Ladens der Klappe in die Kapsel des Ablagesystems stärker gecrimpt als andere. Hierbei eventuell entstehende Gewebeschäden wurden nicht im Rahmen dieser oder einer Vorläuferstudie untersucht, daher können Folgen des Crimpings auf die von uns implantierten Klappen nicht sicher benannt werden.

Darüber hinaus könnten bei der funktionellen Entwicklung der von uns implantierten dTEHV schafsspezifische Erkrankungen und hämodynamische Eigenheiten eine Rolle spielen, die sich im menschlichen Organismus konträr dazu darstellen würden. Die zweidimensionale Echokardiographie stellte sich zwar als geeignetes Mittel zur qualitativen Untersuchung der Klappenfunktion dar, jedoch konnte über diese Methodik kein Aufschluss über die dreidimensionale Klappenmorphologie in-vivo gewonnen werden. Transösophageale 3D-Echokardiographie wäre hierbei sicherlich von Nutzen gewesen um weitere Informationen über das Schlussverhalten der dTEHV zu generieren, sowie die sich entwickelnden zentralen Insuffizienzen besser darstellen zu können.

Bezüglich des Datensatzes muss gesagt werden, dass leider nicht bei allen Tieren jede Follow-up Untersuchung wahrgenommen werden konnte. Teilweise wurde Untersuchungen aufgrund von Personalmangel nicht durchgeführt, was zu Lücken im Datensatz des funktionellen Follow-ups führte. Daher sind die ganz exakten Verläufe der Funktionalität der dTEHV nicht immer im Detail darzustellen gewesen. Spätestens nach 12 Monaten wurden die implantierten Klappen wieder explantiert, auch wenn sie noch eine gute Funktionalität aufwiesen. Hierbei wäre auch der weitere Verlauf der Funktionalität, sowie die generelle Entwicklung der dTEHV interessant zu beobachten gewesen.

Zieht man all diese Faktoren in Betracht, so ist generell auch zu beachten, dass ein Erfolg im Großtiermodell nicht automatisch bedeutet, dass in einem möglichen Heilversuch im Menschen ebenfalls ein solcher Erfolg zu erwarten ist, wie Hjortnaes et al. bereits beschrieben [109].

4.7 Ausblick

„The next step in successfully translating heart valve tissue engineering to in vivo follow-up studies is the development of in vivo noninvasive techniques that are able to assess the functionality of tissue-engineered heart valves, without having to explant the tissue-engineered heart valve. This could potentially lead to important tools usable by physician.“ – So schreiben Hjortnaes et al. 2009 in *Tissue Engineering Part B*. [109]

Sie schlagen mit der MRT eine nicht- oder minimalinvasive Methodik vor, um strukturiert die Funktionalität einer tissue engineeren Herzklappe über einen längeren Zeitraum hinweg zu beobachten. Dieser Schritt des in-vivo Monitorings ist bereits durch die von uns angewandte Methodik erfolgt und die Funktionalität einer dTEHV über ein Jahr hinweg im Großtiermodell aufgezeichnet worden. Schoen et al. schlugen bereits 2011 vor, Ergebnisse aus in-vitro und in-vivo Experimenten zu validieren und in Einklang zu bringen [4]. Auch dies ist durch den Abgleich der computergestützten Simulationen mit den funktionellen Daten unserer in-vivo Studie geschehen.

Ein nächster möglicher Schritt auf dem Weg der Zulassung einer dezellularisierten, tissue engineeren Herzklappe für erste Heilversuche wäre die Erfüllung von ISO-Normen. Für kardiovaskuläre Implantate, spezieller Herklappenprothesen, gilt es die Norm nach DIN EN ISO 5840 zu erfüllen. Ebenso wichtig wie wissenschaftlich relevant wäre die Möglichkeit der längeren Standzeit der Schafe. In der von uns durchgeführten Studie wurden alle Klappen nach spätestens 52 Wochen explantiert, auch wenn die jeweilige dTEHV noch eine gute Funktionalität aufwies. Dabei wäre es aufschlussreich zu sehen, wie sich die Klappenfunktion über einen Zeitraum von 18, 24 oder noch mehr Monaten entwickelt. Ebenso erstrebenswert wäre es, mechanistisch auf die zellulären Abläufe innerhalb der dTEHV zu verschiedenen Zeitpunkten während des Remodelings blicken zu können. Vor allem die Zeitpunkte 24 und 40 Wochen nach Implantation sind hier von großem Interesse, da zu diesen Zeitpunkten Veränderungen in der Funktionalität der dTEHV auf eine Veränderung des Remodeling-Prozesses hindeuten. Es könnte hierzu ein histologischer Vergleich angestrebt werden. Darüber hinaus ist die Erforschung bioresorbierbarer Polymer- oder Magnesiumstents erstrebenswert, um ein Wachstum der dTEHV nicht durch den Stent zu limitieren. Es spielen vor allem Bioresorbierbarkeit, Radialkraft, die Geometrie des Stents und seine Strahlendurchlässigkeit eine große Rolle bei der Entwicklung eines bioresorbierbaren Stents [110]. Um die Homogenität des Scaffolds oder mit Zellen beimpften Gewebes weiter zu optimieren, sowie die Geometrie und biomechanischen Eigenschaften einfacher und schneller anzupassen, bietet das Bioprinting eine mögliche Methode, um das Herstellungsverfahren weiter zu optimieren [111]. Dies könnte so genutzt werden, dass die Homogenität der Klappen weiter

standardisiert würde und eine größere Einheitlichkeit der implantierten tissue-engineerten Herzklappen erreicht würde.

Auf dem Weg zu einer Zertifizierung einer dTEHV als Medizinprodukt oder Zulassung als Arzneimittel für neuartige Therapien (englisch Advanced Therapy Medical Product, ATMP) gibt es neben den wissenschaftlichen Erkenntnissen über die komplexen Abläufe beim Tissue Engineering und der Erfüllung von ISO-Normen große regulatorische und infrastrukturelle Anforderungen. Emmert et al. weisen auf die Wichtigkeit dieser Aufgaben nach der rein forschungsbasierten Entwicklung einer dTEHV in ihrer 2017 veröffentlichten Arbeit hin [112]. Gerade im klinischen Setting sollten Strategien entwickelt werden um Patienten nach der Implantation suffizient klinisch überwachen zu können. Die klinische Anwendbarkeit einfacher Implantationsmethoden weiter zu entwickeln, sowie die Erstellung von Standard Operation Procedures (SOP) fallen ebenso in die klinischen Ansprüche an ein solches Medizinprodukt. Darüber hinaus sind infrastrukturelle Anforderungen wie etwa eine akkurate Qualitätskontrolle und Beständigkeit des Produkts durch GMP (Good Manufacturing Practice) zu bewältigen [112].

4.8 Schlussfolgerung

Diese Arbeit beschreibt zum ersten Mal weltweit die in-vivo Testung einer vollständig tissue engineerter dezellularisierter Herzklappe (dTEHV) über den Zeitraum von einem Jahr. Zum Versuchsende konnte eine insgesamt gute Funktionalität der getesteten Herzklappen gezeigt werden. Unsere Studie konnte verschiedene Produktionsreihen dieser tissue engineerter Herzklappen miteinander vergleichen und wegweisende Ergebnisse für die optimale Produktion der Klappen im Bioreaktor liefern. Es konnte bewiesen werden, dass durch die Anpassung der Geometrie von der ersten Generation solcher dTEHV die Mechanismen, welche bei der ersten Generation der dTEHV zum funktionellen Versagen führten, überwunden werden konnten. Im Gegensatz zur ersten Generation von dTEHV wurden vereinzelt Kalkablagerungen innerhalb der Klappen gefunden, insgesamt zeigte sich jedoch ein zufriedenstellender Remodelingprozess mit vollständiger Reendothelialisierung und einem Gewebeumbau, welcher dem einer nativen Herzklappe sehr ähnlich ist. Nach etwa 24 Wochen scheint sich hierbei ein Gleichgewicht einzustellen. Diese Arbeit konnte wichtige Faktoren benennen und diskutieren um die Interaktion zwischen Anatomie, Histologie und Physiologie während des ablaufenden Remodelingprozesses zu verstehen und so zu leiten, dass die implantierte tissue engineerter Herzklappe eine gute Funktionalität zeigt.

Abschließend kann daher folgender Schluss gezogen werden:

1. Die zweite Generation dezellularisierter, tissue engineerter Herzklappen bot eine deutlich bessere Funktionalität als die erste Generation.
2. Wirkliche Langzeitergebnisse über eine Nachbeobachtungszeit von über 12 Monaten stehen noch aus, jedoch scheint es durchaus plausibel, dass die Funktionalität auch über einen größeren Zeitraum hinweg stabil bleibt.
3. Computergestützte CFD-Simulationen konnten dabei helfen, eine neue Geometrie für die zu implantierenden Herzklappen zu entwickeln.
4. Ein Remodelingprozess scheint in den Klappen stattzufinden, der die dTEHV durch aktive Umbauprozesse an anatomische und physiologische Begebenheiten anpasst.

Aufgrund der Ergebnisse in der dargestellten Arbeit scheint ein Wachstum der Klappe im heranwachsenden Organismus sowie eine gute Funktionalität über einen noch längeren Zeitraum möglich. Weitere Studien mit dem hier präsentierten Konzept der Herstellung, Implantation und Testung dezellularisierter, tissue engineerter Herzklappen sind daher empfehlenswert.

5 Literaturverzeichnis

1. Gerhard Aumüller, G.A., Andreas Doll, Jürgen Engele, Joachim Kirsch, Siegfried Mense, Dieter Reißig, Jürgen Salvetter, Wolfgang Schmidt, Frank Schmitz, Erik Schulte, Katharina Panel-Borowski, Werner Wolff, Laurenz J. Wurzinger, Hans-Gerhard Zilch, *Duale Reihe Anatomie*. Vol. 2. 2010: Thieme.
2. Michael Schünke, E.S., Udo Schumacher, *Prometheus - Lernatlas der Anatomie*. Innere Organe. Vol. 4. 2016.
3. Hascoët, S., P. Acar, and Y. Boudjemline, *Transcatheter pulmonary valvulation: Current indications and available devices*. Archives of Cardiovascular Diseases, 2014. **107**(11): p. 625-634.
4. Schoen, F.J., *Heart valve tissue engineering: quo vadis?* Curr Opin Biotechnol, 2011. **22**(5): p. 698-705.
5. Dijkman, P.E., A. Driessen-Mol, L. Frese, S.P. Hoerstrup, and F.P.T. Baaijens, *Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts*. Biomaterials, 2012. **33**(18): p. 4545-4554.
6. Martin Misfeld, H.-H.S., *Heart valve macro- and microstructure*. Philosophical Transactions of the Royal Society, 2007. **362**.
7. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. Vol. 3. 2009, Kiel: Thieme.
8. Hoffman, J.I.E. and S. Kaplan, *The incidence of congenital heart disease*. Journal of the American College of Cardiology, 2002. **39**(12): p. 1890-1900.
9. van der Linde, D., E.E. Konings, M.A. Slager, M. Witsenburg, W.A. Helbing, J.J. Takkenberg, and J.W. Roos-Hesselink, *Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(21): p. 2241-7.
10. Fahed, A.C., B.D. Gelb, J.G. Seidman, and C.E. Seidman, *Genetics of congenital heart disease: the glass half empty*. Circ Res, 2013. **112**(4): p. 707-20.
11. Dolk, H., M. Loane, E. Garne, and G. European Surveillance of Congenital Anomalies Working, *Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005*. Circulation, 2011. **123**(8): p. 841-9.
12. Reimer, J., Z. Syedain, B. Haynie, M. Lahti, J. Berry, and R. Tranquillo, *Implantation of a Tissue-Engineered Tubular Heart Valve in Growing Lambs*. Ann Biomed Eng, 2017. **45**(2): p. 439-451.
13. Gatzoulis, M.A., S. Balaji, S.A. Webber, S.C. Siu, J.S. Hokanson, C. Poile, M. Rosenthal, M. Nakazawa, J.H. Moller, P.C. Gillette, G.D. Webb, and A.N. Redington, *Risk factors for*

- arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot: a multicentre study*. The Lancet, 2000. **356**(9234): p. 975-981.
14. Grigaliūnas, G., L. Gumbienė, N. Valevičienė, M. Matačiūnas, V. Tarutis, G. Marinskis, and A. Aidietis, *Late arrhythmia in patients with repaired tetralogy of Fallot: who is at risk?* Seminars in Cardiovascular Medicine, 2015. **21**(1): p. 1-8.
 15. Bouzas, B., P.J. Kilner, and M.A. Gatzoulis, *Pulmonary regurgitation: not a benign lesion*. Eur Heart J, 2005. **26**(5): p. 433-9.
 16. Henaine, R., F. Roubertie, M. Vergnat, and J. Ninet, *Valve replacement in children: a challenge for a whole life*. Arch Cardiovasc Dis, 2012. **105**(10): p. 517-28.
 17. Kheradvar, A., E.M. Groves, L.P. Dasi, S.H. Alavi, R. Tranquillo, K.J. Grande-Allen, C.A. Simmons, B. Griffith, A. Falahatpisheh, C.J. Goergen, M.R. Mofrad, F. Baaijens, S.H. Little, and S. Canic, *Emerging trends in heart valve engineering: Part I. Solutions for future*. Ann Biomed Eng, 2015. **43**(4): p. 833-43.
 18. Yacoub, M.H. and J.J. Takkenberg, *Will heart valve tissue engineering change the world?* Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2005. **2**(2): p. 60-1.
 19. Fioretta, E.S., P.E. Dijkman, M.Y. Emmert, and S.P. Hoerstrup, *The future of heart valve replacement: recent developments and translational challenges for heart valve tissue engineering*. J Tissue Eng Regen Med, 2016.
 20. Cannegieter, S.C., F.R. Rosendaal, and E. Briet, *Thromboembolic and Bleeding Complications in Patients with Mechanical Heart-Valve Prostheses*. Circulation, 1994. **89**(2): p. 635-641.
 21. Head, S.J., M. Celik, and A.P. Kappetein, *Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement*. Eur Heart J, 2017.
 22. Myken, P.S. and O. Bech-Hansen, *A 20-year experience of 1712 patients with the Biocor porcine bioprosthesis*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(1): p. 76-81.
 23. Hammermeister, K., G.K. Sethi, W.G. Henderson, F.L. Grover, C. Oprian, and S.H. Rahimtoola, *Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial*. Journal of the American College of Cardiology, 2000. **36**(4): p. 1152-1158.
 24. Lee, C., C.S. Park, C.H. Lee, J.G. Kwak, S.J. Kim, W.S. Shim, J.Y. Song, E.Y. Choi, and S.Y. Lee, *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): p. 351-8.

25. Schoen, F.J. and R.J. Levy, *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention*. Ann Thorac Surg, 2005. **79**(3): p. 1072-80.
26. Manji, R.A., L.F. Zhu, N.K. Nijjar, D.C. Rayner, G.S. Korbitt, T.A. Churchill, R.V. Rajotte, A. Koshal, and D.B. Ross, *Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection*. Circulation, 2006. **114**(4): p. 318-27.
27. Manji, R.A., A.H. Menkis, B. Ekser, and D.K.C. Cooper, *The future of bioprosthetic heart valves*. Indian Journal of Medical Research, 2012. **135**(2): p. 150-151.
28. Nishimura, R.A., C.M. Otto, R.O. Bonow, B.A. Carabello, J.P. Erwin, 3rd, L.A. Fleisher, H. Jneid, M.J. Mack, C.J. McLeod, P.T. O'Gara, V.H. Rigolin, T.M. Sundt, 3rd, and A. Thompson, *2017 AHA/ACC Focused Update of the 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2017. **70**(2): p. 252-289.
29. Zubairi, R., S. Malik, R.D. Jaquiss, M. Imamura, J. Gossett, and W.R. Morrow, *Risk factors for prosthesis failure in pulmonary valve replacement*. Ann Thorac Surg, 2011. **91**(2): p. 561-5.
30. Milan Lisy, G.K., Katja Schenke-Layland, Kelvin G.M. Brockbank, Anna Biermann, and Ulrich Alfred Stock, *Allograft Heart Valves: Current Aspects and Future Applications*. BIOPRESERVATION AND BIOBANKING, 2017. **15**(2): p. 148-157.
31. Ringewald, J.M. and E.J. Suh, *Transcatheter pulmonary valve insertion: when, how, and why*. Cardiol Young, 2012. **22**(6): p. 696-701.
32. Bonhoeffer, P., Y. Boudjemline, Z. Saliba, J. Merckx, Y. Aggoun, D. Bonnet, P. Acar, J. Le Bidois, D. Sidi, and J. Kachaner, *Percutaneous replacement of pulmonary valve in a right-ventricle to pulmonary-artery prosthetic conduit with valve dysfunction*. The Lancet, 2000. **356**(9239): p. 1403-1405.
33. Bonhoeffer, P., Y. Boudjemline, S.A. Qureshi, J. Le Bidois, L. Iserin, P. Acar, J. Merckx, J. Kachaner, and D. Sidi, *Percutaneous insertion of the pulmonary valve*. Journal of the American College of Cardiology, 2002. **39**(10): p. 1664-1669.
34. Vezmar, M., R. Chaturvedi, K.J. Lee, C. Almeida, C. Manlhiot, B.W. McCrindle, E.M. Horlick, and L.N. Benson, *Percutaneous pulmonary valve implantation in the young 2-year follow-up*. JACC Cardiovasc Interv, 2010. **3**(4): p. 439-48.
35. Ghobrial, J. and J. Aboulhosn, *Impact of Right-Sided-Catheter-Based Valve Implantation on Decision-Making in Congenital Heart Disease*. Curr Cardiol Rep, 2016. **18**(4): p. 33.

36. Amir Khosravi, O.W., *TAVI 2018: From guidelines to practice*. e-Journal of Cardiology Practice, 2018. **15**(29).
37. Damien Kenny, Z.M.H., *The evolution of transcatheter pulmonary valve replacement*. Expert Rev. Cardiovasc. Ther. , 2013. **11**(7): p. 795–797.
38. Langer, R. and J. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-926.
39. Vacanti, C.A., *History of tissue engineering and a glimpse into its future*. Tissue Engineering, 2006. **12**(5): p. 1137-1142.
40. Hutmacher, D.W. and S. Cool, *Concepts of scaffold-based tissue engineering--the rationale to use solid free-form fabrication techniques*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(4): p. 654-69.
41. Langer, R. and J. Vacanti, *Advances in tissue engineering*. J Pediatr Surg, 2016. **51**(1): p. 8-12.
42. Neuenschwander, S. and S.P. Hoerstrup, *Heart valve tissue engineering*. Transpl Immunol, 2004. **12**(3-4): p. 359-65.
43. Hinton, R.B. and K.E. Yutzey, *Heart valve structure and function in development and disease*. Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 29-46.
44. Paul W. Riem Vis, J.K., Joost P.G. Sluijter, Lex A. van Herwerden, Carlijn V.C. Bouten, *Environmental regulation of valvulogenesis: implications for tissue engineering*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2010. **39**(1).
45. Shinoka, T., C.K. Breuer, R.E. Tanel, G. Zund, T. Miura, P.X. Ma, R. Langer, J.P. Vacanti, and J.E. Mayer, *Tissue engineering heart valves: Valve leaflet replacement study in a lamb model*. Annals of Thoracic Surgery, 1995. **60**(6): p. S513-S516.
46. Hoerstrup, S.P., R. Sodian, S. Daebritz, J. Wang, E.A. Bacha, D.P. Martin, A.M. Moran, K.J. Guleserian, J.S. Sperling, S. Kaushal, J.P. Vacanti, F.J. Schoen, and J.E. Mayer, *Functional living trileaflet heart valves grown in vitro*. Circulation, 2000. **102**(19): p. 44-49.
47. Simon P. Hoerstrup, M.A.K., MD; Serguei Melnitchouk, MD; Andreas Trojan, MD; Karim Eid, MD; Jay Tracy, Ralf Sodian, MD; Jeroen F. Visjager, PhD; Stefan A. Kolb, MD; Jurg Grunenfelder, MD; Gregor Zund, MD; Marko I. Turina, MD, *Tissue Engineering of Functional Trileaflet Heart Valves From Human Marrow Stromal Cells*. Circulation, 2002. **106**: p. 143-150.
48. Mol, A., M.C. Rutten, N.J. Driessen, C.V. Bouten, G. Zund, F.P. Baaijens, and S.P. Hoerstrup, *Autologous human tissue-engineered heart valves: prospects for systemic application*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I152-8.

49. Ali, M.L., S.P. Kumar, K. Bjornstad, and C.M. Duran, *The sheep as an animal model for heart valve research*. Cardiovasc Surg, 1996. **4**(4): p. 543-9.
50. Rashid, S.T., H.J. Salacinski, G. Hamilton, and A.M. Seifalian, *The use of animal models in developing the discipline of cardiovascular tissue engineering: a review*. Biomaterials, 2004. **25**(9): p. 1627-1637.
51. Schoen, F.J., D. Hirsch, R.W. Bianco, and R.J. Levy, *Onset and Progression of Calcification in Porcine Aortic Bioprosthetic Valves Implanted as Orthotopic Mitral-Valve Replacements in Juvenile Sheep*. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 1994. **108**(5): p. 880-887.
52. Mol, A., N.J. Driessen, M.C. Rutten, S.P. Hoerstrup, C.V. Bouten, and F.P. Baaijens, *Tissue engineering of human heart valve leaflets: a novel bioreactor for a strain-based conditioning approach*. Ann Biomed Eng, 2005. **33**(12): p. 1778-88.
53. Driessen-Mol, A., M.Y. Emmert, P.E. Dijkman, L. Frese, B. Sanders, B. Weber, N. Cesarovic, M. Sidler, J. Leenders, R. Jenni, J. Grünenfelder, V. Falk, F.P.T. Baaijens, and S.P. Hoerstrup, *Transcatheter Implantation of Homologous “Off-the-Shelf” Tissue-Engineered Heart Valves With Self-Repair Capacity*. Journal of the American College of Cardiology, 2014. **63**(13): p. 1320-1329.
54. Spriestersbach, H., A. Prudlo, M. Bartosch, B. Sanders, T. Radtke, F.P.T. Baaijens, S.P. Hoerstrup, F. Berger, and B. Schmitt, *First percutaneous implantation of a completely tissue-engineered self-expanding pulmonary heart valve prosthesis using a newly developed delivery system: a feasibility study in sheep*. Cardiovascular Intervention and Therapeutics, 2017. **32**(1): p. 36-47.
55. Schmitt, B., H. Spriestersbach, O.H.I. D, T. Radtke, M. Bartosch, H. Peters, M. Sigler, L. Frese, P.E. Dijkman, F.P. Baaijens, S.P. Hoerstrup, and F. Berger, *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. **12**(1): p. 62-70.
56. Sanders, B., S. Loerakker, E.S. Fioretta, D.J. Bax, A. Driessen-Mol, S.P. Hoerstrup, and F.P. Baaijens, *Improved Geometry of Decellularized Tissue Engineered Heart Valves to Prevent Leaflet Retraction*. Ann Biomed Eng, 2016. **44**(4): p. 1061-71.
57. Radtke, T., *In vivo Evaluation und Histologie minimalinvasiv implantierter tissue-engineerter Pulmonalklappen im Schafmodell*, in *Dissertation*. 2017, Charité - Universitätsmedizin Berlin: Berlin, Germany. p. 48.

58. Bartosch, M., H. Peters, H. Spriestersbach, O.H.I. D, F. Berger, and B. Schmitt, *A Universal Delivery System for Percutaneous Heart Valve Implantation*. *Ann Biomed Eng*, 2016. **44**(9): p. 2683-94.
59. Silversides, C.K., G.R. Veldtman, J. Crossin, N. Merchant, G.D. Webb, B.W. McCrindle, S.C. Siu, and J. Therrien, *Pressure half-time predicts hemodynamically significant pulmonary regurgitation in adult patients with repaired tetralogy of fallot*. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 2003. **16**(10): p. 1057-1062.
60. Lancellotti, P., C. Tribouilloy, A. Hagendorff, B.A. Popescu, T. Edvardsen, L.A. Pierard, L. Badano, J.L. Zamorano, and I. Scientific Document Committee of the European Association of Cardiovascular, *Recommendations for the echocardiographic assessment of native valvular regurgitation: an executive summary from the European Association of Cardiovascular Imaging*. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2013. **14**(7): p. 611-44.
61. Baumgartner, H., J. Hung, J. Bermejo, J.B. Chambers, A. Evangelista, B.P. Griffin, B. Iung, C.M. Otto, P.A. Pellikka, M. Quinones, E. American Society of, and E. European Association of, *Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice*. *J Am Soc Echocardiogr*, 2009. **22**(1): p. 1-23; quiz 101-2.
62. Zoghbi, W., *Recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with two-dimensional and doppler echocardiography*. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 2003. **16**(7): p. 777-802.
63. Mehta, N.K., J. Kim, J.Y. Siden, S. Rodriguez-Diego, J. Alakbarli, A. Di Franco, and J.W. Weinsaft, *Utility of cardiac magnetic resonance for evaluation of mitral regurgitation prior to mitral valve surgery*. *J Thorac Dis*, 2017. **9**(Suppl 4): p. S246-S256.
64. Farhood Saremi, M.A.G., MD S. Yen Ho, PhD, FRCPath, FESC, FHEA Ziyad M. Hijazi, MD, MPH, FSCAI, FACC, FAAP Damián Sánchez-Quintana, MD, PhD, *CT and MR Imaging of the Pulmonary Valve*. *RadioGraphics*, 2014. **34**(1): p. 51-71.
65. Donath K, B.G., *A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) Technique*. *Journal of Oral Pathology*, 1982. **11**: p. 318-326.
66. Lambert, A.S., *Proximal isovelocity surface area should be routinely measured in evaluating mitral regurgitation: a core review*. *Anesth Analg*, 2007. **105**(4): p. 940-3.
67. Emmert, M.Y., B.A. Schmitt, S. Loerakker, B. Sanders, H. Spriestersbach, E.S. Fioretta, L. Bruder, K. Brakmann, S.E. Motta, V. Lintas, P.E. Dijkman, L. Frese, F. Berger, F.P.T. Baaijens, and S.P. Hoerstrup, *Computational modeling guides tissue-engineered heart*

- valve design for long-term in vivo performance in a translational sheep model.* Sci Transl Med, 2018. **10**(440).
68. Gottlieb, D., T. Kunal, S. Emani, E. Aikawa, D.W. Brown, A.J. Powell, A. Nedder, G.C. Engelmayer, Jr., J.M. Melero-Martin, M.S. Sacks, and J.E. Mayer, Jr., *In vivo monitoring of function of autologous engineered pulmonary valve.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2010. **139**(3): p. 723-31.
 69. Webb, J.G., S. Pasupati, L. Achtem, and C.R. Thompson, *Rapid pacing to facilitate transcatheter prosthetic heart valve implantation.* Catheter Cardiovasc Interv, 2006. **68**(2): p. 199-204.
 70. Paradis, J.M., H.S. Maniar, J.M. Lasala, S. Kodali, M. Williams, B.R. Lindman, R.J. Damiano, Jr., M.R. Moon, R.R. Makkar, V.H. Thourani, V. Babaliaros, K. Xu, G.M. Ayele, L. Svensson, M.B. Leon, and A. Zajarias, *Clinical and Functional Outcomes Associated With Myocardial Injury After Transfemoral and Transapical Transcatheter Aortic Valve Replacement: A Subanalysis From the PARTNER Trial (Placement of Aortic Transcatheter Valves).* JACC Cardiovasc Interv, 2015. **8**(11): p. 1468-79.
 71. Okitsu, K., T. Iritakenishi, T. Imada, M. Iwasaki, S.C. Shibata, and Y. Fujino, *A longer total duration of rapid ventricular pacing does not increase the risk of postprocedural myocardial injury in patients who undergo transcatheter aortic valve implantation.* Heart Vessels, 2017. **32**: p. 1117–1122
 72. Kahn RA, M.D., Marin ML, Hollier LH, Parsons R, Teodorescu V, McLaughlin M., *Safety and Efficacy of High-Dose Adenosine-Induced Asystole During Endovascular AAA Repair.* Journal of Endovascular Therapies, 2007. **7**: p. 292–296.
 73. Davidavicius G, C.A., Shannon J, Arioli F, Ielasi A, Mussardo M, Takagi K, 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 Cardiology, 2011. **23**(11): p. 467-471.
 74. Manoharan, G., A.S. Walton, S.J. Brecker, S. Pasupati, D.J. Blackman, H. Qiao, and I.T. Meredith, *Treatment of Symptomatic Severe Aortic Stenosis With a Novel Resheathable Supra-Annular Self-Expanding Transcatheter Aortic Valve System.* JACC Cardiovasc Interv, 2015. **8**(10): p. 1359-67.
 75. Khoffi, F. and F. Heim, *Mechanical degradation of biological heart valve tissue induced by low diameter crimping: An early assessment.* Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2015. **44**: p. 71-75.

76. Jalal, Z., L. Galmiche, C. Beloin, and Y. Boudjemline, *Impact of percutaneous pulmonary valve implantation procedural steps on leaflets histology and mechanical behaviour: An in vitro study*. Arch Cardiovasc Dis, 2016. **109**(8-9): p. 465-75.
77. Alavi, S.H., E.M. Groves, and A. Kheradvar, *The effects of transcatheter valve crimping on pericardial leaflets*. Ann Thorac Surg, 2014. **97**(4): p. 1260-6.
78. Bourget, J.M., R. Zegdi, J. Lin, P. Wawryko, Y. Merhi, C. Convelbo, J. Mao, Y. Fu, T. Xu, N.O. Merkel, L. Wang, L. Germain, Z. Zhang, and R. Guidoin, *Correlation between structural changes and acute thrombogenicity in transcatheter pericardium valves after crimping and balloon deployment*. Morphologie, 2017. **101**(332): p. 19-32.
79. Flanagan, T.C., J.S. Sachweh, J. Frese, H. Schnöring, N. Gronloh, S. Koch, R.H. Tolba, T. Schmitz-Rode, and S. Jockenhoevel, *In Vivo Remodeling and Structural Characterization of Fibrin-Based Tissue-Engineered Heart Valves in the Adult Sheep Model*. Tissue Engineering Part A, 2009. **15**(10): p. 2965-2976.
80. Syedain, Z., J. Reimer, M. Lahti, J. Berry, S. Johnson, and R.T. Tranquillo, *Tissue engineering of acellular vascular grafts capable of somatic growth in young lambs*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12951.
81. Syedain, Z., J. Reimer, J. Schmidt, M. Lahti, J. Berry, R. Bianco, and R.T. Tranquillo, *6-month aortic valve implantation of an off-the-shelf tissue-engineered valve in sheep*. Biomaterials, 2015. **73**: p. 175-84.
82. de Divitiis, O., S. Fazio, M. Petitto, G. Maddalena, F. Contaldo, and M. Mancini, *Obesity and cardiac function*. Circulation, 1981. **64**(3): p. 477-82.
83. Vesely, I., *The role of elastin in aortic valve mechanics*. J Biomech, 1998. **31**(2): p. 115-23.
84. Tudorache, I., A. Calistru, H. Baraki, T. Meyer, K. Hoffler, S. Sarikouch, C. Bara, A. Gorler, D. Hartung, A. Hilfiker, A. Haverich, and S. Cebotari, *Orthotopic replacement of aortic heart valves with tissue-engineered grafts*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**(15-16): p. 1686-94.
85. Tudorache, I., A. Horke, S. Cebotari, S. Sarikouch, D. Boethig, T. Breyman, P. Beerbaum, H. Bertram, M. Westhoff-Bleck, K. Theodoridis, D. Bobylev, E. Cheptanaru, A. Ciubotaru, and A. Haverich, *Decellularized aortic homografts for aortic valve and aorta ascendens replacement*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **50**(1): p. 89-97.
86. Tudorache, I., K. Theodoridis, H. Baraki, S. Sarikouch, C. Bara, T. Meyer, K. Hoffler, D. Hartung, A. Hilfiker, A. Haverich, and S. Cebotari, *Decellularized aortic allografts versus pulmonary autografts for aortic valve replacement in the growing sheep model*.

- haemodynamic and morphological results at 20 months after implantation.* Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **49**(4): p. 1228-38.
87. Sanders, B., A. Driessen-Mol, C.V.C. Bouten, and F.P.T. Baaijens, *The Effects of Scaffold Remnants in Decellularized Tissue-Engineered Cardiovascular Constructs on the Recruitment of Blood Cells.* Tissue Eng Part A, 2017.
 88. Iop, L. and G. Gerosa, *Guided tissue regeneration in heart valve replacement: from preclinical research to first-in-human trials.* Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 432901.
 89. Iop, L., A. Paolin, P. Aguiari, D. Trojan, E. Cogliati, and G. Gerosa, *Decellularized Cryopreserved Allografts as Off-the-Shelf Allogeneic Alternative for Heart Valve Replacement: In Vitro Assessment Before Clinical Translation.* J Cardiovasc Transl Res, 2017. **10**(2): p. 93-103.
 90. Wald, R.M., A.N. Redington, A. Pereira, Y.L. Provost, N.S. Paul, E.N. Oechslin, and C.K. Silversides, *Refining the assessment of pulmonary regurgitation in adults after tetralogy of Fallot repair: should we be measuring regurgitant fraction or regurgitant volume?* Eur Heart J, 2009. **30**(3): p. 356-61.
 91. Zdradzinski, M., R. Elkin, S. Hart, S. Flamm, and R. Krasuski, *Incremental Value of Cardiac Magnetic Resonance for Assessing Pulmonic Valve Regurgitation.* Journal of Heart Valve Disease, 2015. **24**(4): p. 502-507.
 92. Festa, P., L. Ait-Ali, F. Minichilli, I. Kristo, M. Deiana, and E. Picano, *A new simple method to estimate pulmonary regurgitation by echocardiography in operated fallot: comparison with magnetic resonance imaging and performance test evaluation.* J Am Soc Echocardiogr, 2010. **23**(5): p. 496-503.
 93. Mercer-Rosa, L., W. Yang, S. Kutty, J. Rychik, M. Fogel, and E. Goldmuntz, *Quantifying pulmonary regurgitation and right ventricular function in surgically repaired tetralogy of Fallot: a comparative analysis of echocardiography and magnetic resonance imaging.* Circ Cardiovasc Imaging, 2012. **5**(5): p. 637-43.
 94. Grothoff, M., B. Spors, H. Abdul-Khaliq, and M. Gutberlet, *Evaluation of postoperative pulmonary regurgitation after surgical repair of tetralogy of Fallot: comparison between Doppler echocardiography and MR velocity mapping.* Pediatr Radiol, 2008. **38**(2): p. 186-91.
 95. Hurtado-Aguilar, L.G., S. Mulderrig, R. Moreira, N. Hatam, J. Spillner, T. Schmitz-Rode, S. Jockenhoewel, and P. Mela, *Ultrasound for In Vitro, Noninvasive Real-Time Monitoring and Evaluation of Tissue-Engineered Heart Valves.* Tissue Eng Part C Methods, 2016. **22**(10): p. 974-981.

96. Chessa, M., G. Butera, and M. Carminati, *Intracardiac echocardiography during percutaneous pulmonary valve replacement*. Eur Heart J, 2008. **29**(23): p. 2908.
97. Awad, S.M., S.A. Masood, I. Gonzalez, Q.L. Cao, R.I. Abdulla, M.G. Heitschmidt, and Z.M. Hijazi, *The use of intracardiac echocardiography during percutaneous pulmonary valve replacement*. Pediatr Cardiol, 2015. **36**(1): p. 76-83.
98. Zurcher, F., N. Brugger, S.E. Jahren, S.F. de Marchi, and C. Seiler, *Quantification of Multiple Mitral Regurgitant Jets: An In Vitro Validation Study Comparing Two- and Three-Dimensional Proximal Isovelocity Surface Area Methods*. J Am Soc Echocardiogr, 2017. **30**(5): p. 511-521.
99. Jamil, M., O. Ahmad, K.K. Poh, and C.H. Yap, *Feasibility of Ultrasound-Based Computational Fluid Dynamics as a Mitral Valve Regurgitation Quantification Technique: Comparison with 2-D and 3-D Proximal Isovelocity Surface Area-Based Methods*. Ultrasound Med Biol, 2017. **43**(7): p. 1314-1330.
100. Takagi, K., S. Fukunaga, A. Nishi, T. Shojima, K. Yoshikawa, H. Hori, H. Akashi, and S. Aoyagi, *In vivo recellularization of plain decellularized xenografts with specific cell characterization in the systemic circulation: histological and immunohistochemical study*. Artif Organs, 2006. **30**(4): p. 233-41.
101. Aikawa, E., R.S. Hennessy, J.L. Go, R.R. Hennessy, B.J. Tefft, S. Jana, N.J. Stoyles, M.A. Al-Hijji, J.J. Thaden, S.V. Pislaru, R.D. Simari, J.M. Stulak, M.D. Young, and A. Lerman, *Recellularization of a novel off-the-shelf valve following xenogenic implantation into the right ventricular outflow tract*. Plos One, 2017. **12**(8).
102. Theodoridis, K., I. Tudorache, A. Calistru, S. Cebotari, T. Meyer, S. Sarikouch, C. Bara, R. Brehm, A. Haverich, and A. Hilfiker, *Successful matrix guided tissue regeneration of decellularized pulmonary heart valve allografts in elderly sheep*. Biomaterials, 2015. **52**: p. 221-8.
103. Sarikouch, S., A. Horke, I. Tudorache, P. Beerbaum, M. Westhoff-Bleck, D. Boethig, O. Repin, L. Maniuc, A. Ciubotaru, A. Haverich, and S. Cebotari, *Decellularized fresh homografts for pulmonary valve replacement: a decade of clinical experience*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **50**(2): p. 281-90.
104. Neumann, A., S. Cebotari, I. Tudorache, A. Haverich, and S. Sarikouch, *Heart valve engineering: decellularized allograft matrices in clinical practice*. Biomed Tech (Berl), 2013. **58**(5): p. 453-6.
105. Iop, L., A. Bonetti, F. Naso, S. Rizzo, S. Cagnin, R. Bianco, C. Dal Lin, P. Martini, H. Poser, P. Franci, G. Lanfranchi, R. Busetto, M. Spina, C. Basso, M. Marchini, A.

- Gandaglia, F. Ortolani, and G. Gerosa, *Decellularized allogeneic heart valves demonstrate self-regeneration potential after a long-term preclinical evaluation*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99593.
106. Quinn, R.W., A.A. Bert, G.L. Converse, E.E. Buse, S.L. Hilbert, W.B. Drake, and R.A. Hopkins, *Performance of allogeneic bioengineered replacement pulmonary valves in rapidly growing young lambs*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2016. **152**(4): p. 1156-1165 e4.
 107. Helder, M.R., N.T. Kouchoukos, K. Zehr, J.A. Dearani, J.J. Maleszewski, C. Leduc, C.N. Heins, and H.V. Schaff, *Late durability of decellularized allografts for aortic valve replacement: A word of caution*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2016. **152**(4): p. 1197-9.
 108. Loerakker, S., G. Argento, C.W. Oomens, and F.P. Baaijens, *Effects of valve geometry and tissue anisotropy on the radial stretch and coaptation area of tissue-engineered heart valves*. J Biomech, 2013. **46**(11): p. 1792-800.
 109. Hjortnaes, J., C.V.C. Bouten, L.A. Van Herwerden, P.F. Grundeman, and J. Kluin, *Translating Autologous Heart Valve Tissue Engineering from Bench to Bed*. Tissue Engineering Part B-Reviews, 2009. **15**(3): p. 307-317.
 110. Im, S.H., Y. Jung, and S.H. Kim, *Current status and future direction of biodegradable metallic and polymeric vascular scaffolds for next-generation stents*. Acta Biomater, 2017.
 111. Jana, S. and A. Lerman, *Bioprinting a cardiac valve*. Biotechnol Adv, 2015. **33**(8): p. 1503-21.
 112. Emmert, M.Y., E.S. Fioretta, and S.P. Hoerstrup, *Translational Challenges in Cardiovascular Tissue Engineering*. J Cardiovasc Transl Res, 2017. **10**(2): p. 139-149.

6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Leon Bruder, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„In-vivo-Funktionalität transvenös implantierter dezellularisierter, tissue engineerter Pulmonalklappen im Großtiermodell über ein Jahr“** / **„One-year in-vivo functionality of transvenously implanted, decellularized, tissue engineered pulmonary heart valves in a large animal model“** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

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

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

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

Datum

Unterschrift

7 Anteilserklärung

Leon Bruder hatte folgenden Anteil an den folgenden Veröffentlichungen:

- Maximilian Y. Emmert, MD, PhD, Boris A. Schmitt, MD, Sandra Loerakker, PhD, Bart Sanders, PhD, Hendrik Spriestersbach, MD, Emanuela Fioretta, PhD, **Leon Bruder**, Kerstin Brakmann, VS, Petra Dijkman, PhD, Laura Frese, PhD, Felix Berger, MD, Frank Baaijens, PhD, Simon P. Hoerstrup, MD, PhD:
Computational modeling guides tissue-engineered heart valve design for long-term in vivo performance in a translational sheep model.
Science Translational Medicine, 2018.
Beitrag: Maßgebliche Beteiligung an der Durchführung der Implantationen, sowie der gesamten Versuche im Rahmen des funktionellen Follow-ups und der Explantationen; Datenauswertung der im Tiermodell erhobenen Daten; Erstellung von Tabellen und Abbildungen, die in der Veröffentlichung verwendet wurden.
- **Leon Bruder**, Hendrik Spriestersbach, Marco Bartosch, Kerstin Brakmann, Bart Sanders, Sandra Loerakker, Frank Baaijens, Petra E. Dijkman, Laura Frese, Maximilian Emmert, Simon Hoerstrup, Felix Berger and Boris Schmitt:
Breakthrough one-year functionality of transvenously implanted, decellularized tissue-engineered pulmonary heart valves (dTEHV) in a sheep model.
Vortrag auf der 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), 17.-20. Februar 2018, Leipzig, Deutschland als einer von vier Finalvorträgen im Rahmen des “Young Investigator Award”.
Beitrag: Maßgebliche Beteiligung an der Durchführung der Implantationen, sowie der gesamten Versuche im Rahmen des funktionellen Follow-ups und der Explantationen; Auswertung der funktionellen und histologischen Daten; Konzeptualisierung des Vortrags, Erstellen aller Abbildungen und Tabellen; Vortragender.
- **Leon Bruder**, Hendrik Spriestersbach, Marco Bartosch, Kerstin Brakmann, Bart Sanders, Frank Baaijens, Simon Hoerstrup, Felix Berger and Boris Schmitt.
One-year functionality of transvenously implanted, decellularized tissue-engineered pulmonary heart valves (dTEHV) in a sheep model.
Poster-Präsentation und Vortrag auf der 28. ESC, 27. – 30. September 2017, Berlin, Deutschland. Ausgezeichnet als „bester Postervortrag“ in der Kategorie „Padiatrie“

Beitrag: Maßgebliche Beteiligung an der Durchführung der Implantationen, sowie der gesamten Versuche im Rahmen des funktionellen Follow-ups und der Explantationen; Auswertung der funktionellen und histologischen Daten; Konzeptualisierung des Posters und Vortrags, Erstellen aller Abbildungen und Tabellen; Vortragender.

- H. Spriestersbach, B. Sanders, E. Fioretta, **L. Bruder**, D. O h-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

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

Beitrag: Maßgebliche Beteiligung an der Durchführung der Implantationen, sowie der gesamten Versuche im Rahmen des funktionellen Follow-ups und der Explantationen; Datenauswertung der funktionellen Daten; Mithilfe beim Erstellen von Tabellen und Abbildungen die im Vortrag verwendet wurden.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

8 Lebenslauf

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

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

9 Publikationsliste

Publikationen

1. Maximilian Y. Emmert, MD, PhD, Boris A. Schmitt, MD, Sandra Loerakker, PhD, Bart Sanders, PhD, Hendrik Spriestersbach, MD, Emanuela Fioretta, PhD, **Leon Bruder**, Kerstin Brakmann, VS, Petra Dijkman, PhD, Laura Frese, PhD, Felix Berger, MD, Frank Baaijens, PhD, Simon P. Hoerstrup, MD, PhD
Computationally inspired rational design guards long-term in-vivo performance of engineered living heart valves consistent with predicted tissue remodeling,
Science Translational Medicine, 2018

Vorträge und Postervorstellungen

1. H. Spriestersbach, B. Sanders, E. Fioretta, **L. Bruder**, D. O h-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
Vortrag auf der 47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), 6.-9.Juni 2015, Weimar.
2. **Leon Bruder**, Hendrik Spriestersbach, Marco Bartosch, Kerstin Brakmann, Bart Sanders, Frank Baaijens, Simon Hoerstrup, Felix Berger and Boris Schmitt.
One-year functionality of transvenously implanted, decellularized tissue-engineered pulmonary heart valves (dTEHV) in a sheep model.
Poster-Präsentation und Vortrag auf der 28. ESC, 27. – 30. September 2017, Berlin, Deutschland. Ausgezeichnet als „bester Postervortrag“ in der Kategorie „Padiatrie“
3. **Leon Bruder**, Hendrik Spriestersbach, Marco Bartosch, Kerstin Brakmann, Bart Sanders, Sandra Loerakker, Frank Baaijens, Petra E. Dijkman, Laura Frese, Maximilian Emmert, Simon Hoerstrup, Felix Berger and Boris Schmitt
Breakthrough one-year functionality of transvenously implanted, decellularized tissue-engineered pulmonary heart valves (dTEHV) in a sheep model.
Vortrag auf der 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), 17.-20. Februar 2018, Leipzig, Deutschland als einer von vier Finalvorträge im Rahmen des „Young Investigator Award“.

10 Danksagung

Herrn PD Dr. med. Boris Schmitt und Herrn Prof. Dr. med. Felix Berger möchte ich für die Überreichung des Themas dieser Dissertation sowie für die fortwährende Unterstützung und gute Zusammenarbeit danken.

Großer Dank gebührt auch der Deutschen Herzstiftung e.V. für die Verleihung des Kaltenbach-Doktorandenstipendiums.

Moritz – ohne deine Hilfe bei der Erstellung mancher Abbildungen und Grafiken wäre diese Arbeit nicht dieselbe geworden! Horst Becker und Zurab Sumbadze möchte ich ebenso für die Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen danken.

Darüber hinaus möchte ich mich beim ganzen LifeValve-Team, insbesondere Kerstin Brakmann, Katharina Weber, Marco Bartosch, Stefan Schröder, Hendrik Spriestersbach und Valentin Stegner für die gute und angenehme Zusammenarbeit während der Versuche sowie allen Konsortialpartnern des Projektes für den regen wissenschaftlichen Austausch danken.

Helena

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung sowie für aufmunternde und motivierende Gespräche in den komplizierteren Zeiten während des Verfassens dieser Arbeit bedanken.