

IN VITRO ENTWICKLUNG UND
HISTOLOGISCHE EVALUATION EINER TISSUE-
ENGINEERTEN STENTKLAPPE ZUM PERKUTANEN
PULMONALKLAPPENERSATZ AM OVINEN MODELL

Aus der Klinik für
Herz- und Gefäßchirurgie
(Leiter Prof. Dr. med. J.T. Cremer)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

IN VITRO ENTWICKLUNG UND
HISTOLOGISCHE EVALUATION EINER TISSUE-
ENGINEERTEN STENTKLAPPE ZUM PERKUTANEN
PULMONALKLAPPENERSATZ AM OVINEN MODELL

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Andreas Pirogow
geboren in Alma-Ata (Kasachstan)

Kiel 2013

1. Referent: Prof. Dr. Lutter, Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie
2. Korreferent: PD. Dr. Egberts, Klinik für Allgemeine und Thoraxchirurgie
Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2013
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21.08.2013

gez. Prof. Dr. Johann Roider

Meiner Familie in aufrichtiger Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herzchirurgie-Hintergrund	1
1.2	Verschiedene Arten von Klappenprothesen	2
1.3	Das Konzept des Tissue Engineerings.....	3
1.4	Perkutaner Klappenersatz	4
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	5
2.1	Material	6
2.1.1	Materialien für die Zellkultur.....	6
2.1.2	Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur	7
2.1.3	Antibiotika Lösungen	7
2.1.4	Chemikalien und Materialien für Hämalaun-Eosinfärbung.....	7
2.1.5	Geräte.....	8
2.2	Methoden	9
2.2.1	Zellgewinnung.....	9
2.2.2	Isolation und Anzucht von ovinen Zellen	11
2.2.2.1	Isolierung der Endothelzellen.....	11
2.2.2.2	Isolierung der glatten Muskelzellen.....	12
2.2.2.3	Passagieren von Zellen	13
2.2.3	Das Applikationssystem.....	14
2.2.3.1	Der Applikationskatheter... ..	14
2.2.3.2	Der Stent.....	15
2.2.4	Herstellung eines pulmonalklappentragenden Stents.....	16
2.2.4.1	Präparation des ovinen Dünndarms	16
2.2.4.2	Präparation einer porcinen Pulmonalklappe	17
2.2.4.3	Einbringen der Pulmonalklappe in den Stent.....	18
2.2.5	Dezellularisierung der Pulmonalklappe.....	18
2.2.6	Die <i>In vitro</i> Besiedelung des klappentragenden Stents	19
2.2.6.1	Der Bioreaktor.....	19
2.2.6.2	Die <i>in vitro</i> Besiedelung mit glatten Muskelzellen	20
2.2.6.3	Einbau des Stents in den Bioreaktor.....	20
2.2.6.4	Die <i>in vitro</i> Besiedelung mit Endothelzellen.....	21

2.2.7 Färbung der Pulmonalklappentasche	22
2.2.7.1 Fixierung und Einbetten von Gewebeproben.....	22
2.2.7.2 Hämalaun-Eosinfärbung an Paraffinschnitten	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Herstellung eines klappentragenden Stents	24
3.1.1 Präparation	24
3.1.2 Dezellularisierung der Pulmonalklappe.....	25
3.1.3 Histologische Untersuchung einer dezellularisierten Pulmonalklappe	26
3.2 Die Zellgewinnung und <i>in vitro</i> Besiedelung	27
3.2.1 Anzucht und Kultivierung von glatten Muskelzellen	27
3.2.2 Die <i>in vitro</i> Besiedelung mit glatten Muskelzellen.....	28
3.2.3 Anzucht und Kultivierung von Endothelzellen.....	29
3.2.4 Die <i>in vitro</i> Besiedelung mit Endothelzellen.....	30
3.2.5 Vitalitätskontrolle.....	30
3.3 Makroskopische Untersuchung des klappentragenden Stents	31
3.4 Zeitplan zur Herstellung eines klappentragenden Stents.....	32
4 Diskussion.....	33
4.1 Der Grundgedanke des Herzklappen-Tissue-Engineerings.....	33
4.2 Die Dezellularisierung.....	34
4.3 Einfluss der <i>in vitro</i> Besiedelung.....	34
4.4 Zellen für die <i>in vitro</i> Besiedelung.....	35
4.4.1 Endothelzellextraktion.....	36
4.4.2 Extraktion von glatten Muskelzellen.....	37
4.4.3 Expansion der Primärzellen.....	37
4.5 Die <i>in vitro</i> Besiedelung	37
4.6 Herstellung eines tissue engineerten Pulmonalklappenstents.....	38
4.7 Einsatz vom ovinen Dünndarm.....	39
4.8 Ausblick	40
5 Zusammenfassung.....	42
6 Literaturverzeichnis	43
7 Danksagung	49
8 Lebenslauf	50

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
mg/kg KG/h	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht pro Stunde
A. carotis int.	Arteria carotis interna
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
z. B.	zum Beispiel
cm	Zentimeter
h	Stunde
mg	Milligramm
max.	maximal
L	Liter
min	Minute
ml	Milliliter
NaCl	Natrium-Chlorid
PBS	Phosphate buffered saline
s	Sekunde
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
Lsg	Lösung
FCS	Fetal Calf Serum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
V. cava inf.	Vena cava inferior
LDL	low density lipoprotein
sog.	so genannt
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
PK	Pulmonalklappe
HE-Färbung	Hämalaun-Eosinfärbung

1. Einleitung

1.1 Herzchirurgie - Hintergrund

Eine Klappendysfunktion kann durch multiple Faktoren entstehen, wobei Infektionen, Medikamente, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, hoher LDL-Cholesterinspiegel, Nikotinabusus und kongenitale Vitien die Hauptursachen sind. Die häufigste Manifestation einer Dysfunktion ist die Verkalkung der Aortenklappe mit nachfolgender Stenose (1, 2), gefolgt von Veränderungen der Mitralklappe zwischen linkem Atrium und linkem Ventrikel. Bedingt ist dieses Verteilungsmuster durch die stärker belastenden Bedingungen des linken Herzens gegenüber dem rechten, bezüglich Druck, Blutfluss und die daraus resultierende Mehrbeanspruchung der Klappen.

Vitien der Pulmonal- und Trikuspidalklappe im rechten Herzen sind in den meisten Fällen auf kongenitale Anomalien zurückzuführen, wie z. B. die Fallot'sche Tetralogie (Abb.1).

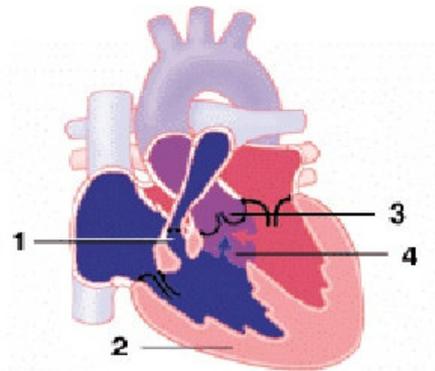


Abb.1: Fallot'sche Tetralogie.

1. Pulmonalklappenstenose; 2. Hypertrophie des rechten Ventrikels; 3. Verlagerung der Aortenwurzel; 4. über einen Ventrikelseptumdefekt; Quelle: medfuerer.de

Darüber hinaus kommt es bei Patienten mit Zustand nach operativer Korrektur des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (RVOT) häufig im Mittel- und Langzeitverlauf zur hämodynamisch relevanten Pulmonalinsuffizienz. Sie wird durch die überwiegende Anzahl der Patienten über lange Zeiträume (ca. 80 bis 90 % bis zu 20 Jahren) relativ gut toleriert, kann jedoch sukzessiv zur Insuffizienz des rechten Ventrikels und später auch zu der des linken Ventrikels führen. Daher ist die frühzeitige Indikationsstellung

zum Pulmonalklappenersatz mit unterschiedlichsten Techniken (durch biologische, mechanische Prothesen oder Conduits wie auch perkutane, interventionelle Klappenimplantationen) besonders bedeutsam (3).

Bei Klappendysfunktion bestehen zwei Operationsmöglichkeiten: Die Klappenrekonstruktion und der Klappenersatz. Meist ist es bei Mitralklappenoperationen möglich, die körpereigene Klappe durch Rekonstruktion zu erhalten. Wenn eine Rekonstruktion nicht durchführbar ist, werden die defekten Herzklappen entfernt und durch eine Prothese ersetzt.

1.2 Verschiedene Arten von Klappenprothesen

Die mechanischen Herzklappenprothesen, die 1951 von Hufnagel und Kollegen erstmals klinisch implantiert wurden, bringen erhebliche Einschränkungen für die Patienten mit sich (4). Diese sind aufgrund der lebenslangen Antikoagulation sowohl durch thromboembolische Komplikationen als auch durch Blutungen gefährdet. Die Blutungsgefahr liegt zwischen 0,5% (5) und 30% (6) pro Patient und Jahr. Eine Studie von Casselman et al. hat bewiesen, dass nach 30 Jahren suffizienter Antikoagulation bei lediglich 23,3% der Patienten keine der beschriebenen Komplikationen auftraten (7). Aufgrund dieser Problematik musste nach Alternativen gesucht werden, bei denen auf eine dauerhafte Antikoagulation verzichtet werden kann.

Über die erste klinische Implantation einer biologischen Herzklappenprothese berichtete Murray im Jahre 1955. Hierbei wurde eine menschliche Aortenklappe, ein sogenannter Allograft, in die Aorta descendens implantiert (8). 1968 beschrieben Bentall und De Bono (9) den kompletten Ersatz der Aortenklappe und der Aorta ascendens. Klinische Nachuntersuchungen zeigten, dass eine in Antibiotika konservierte, humane Herzklappe eine gute hämodynamische Funktion aufweist (10,11). Die Herzklappentaschen sind für lange Zeit zart, aber Kommissuren und Aortenwand zeigen jedoch bereits nach kurzer Zeit Verkalkungen (12). Eine weitere Einschränkung der Anwendung von Allografts besteht in den operativ technischen Schwierigkeiten bei der Implantation. Da kein Gerüst vorhanden ist, können erhebliche Probleme bei der exakten anatomischen Anpassung auftreten.

Um diese Nachteile und Schwierigkeiten zu umgehen, wurden biologische Herzklappenprothesen auf der Basis des tierischen Gewebes, sog. Xenografts entwickelt. Das brachte den Vorteil, dass diese Herzklappenprothesen die Nachfrage

decken konnten und eine große Anzahl unterschiedlicher Klappengrößen zur Verfügung stand. Bei der Entwicklung der Xenografts, mussten verschiedene Probleme, wie optimale Konservierung und Vermeidung von Abstoßungsreaktionen, gelöst werden. Außerdem war die Herzklappenprothese so zu gestalten, dass eine möglichst einfache Implantation möglich wurde. Durch Verbesserungen des Gerüsts, indem kein starres sondern ein flexibles Gerüst eingeführt wurde, konnten die früh- und mittelfristigen Funktionswerte deutlich verbessert werden (13,14). Die Langzeitergebnisse zeigten jedoch erhebliche Veränderungen sowohl an der Herzklappenwand als auch an der Klappentasche (15,16,17). Besonders ausgeprägt waren diese Veränderungen bei Kindern (18,19, 20).

1.3 Das Konzept des Tissue Engineerings

Durch immer engere Verknüpfungen von Techniken aus verschiedensten Wissenschaften wie Biologie, Biotechnologie, Pharmakologie, Chemie und Materialforschung entstanden in den letzten Jahren immer innovativere Medizinprodukte zur Lösung klinischer Probleme. Ein interdisziplinäres Gebiet, welches auf diesem Weg entstand, ist das Tissue Engineering. Die Methode des Tissue Engineering in Bezug auf die regenerative Medizin beruht darauf, lebende Zellen eines Organismus außerhalb des Zielgewebes zu kultivieren, um diese dann in den meist selben Organismus zu implantieren und so eine Gewebefunktion zu erhalten oder wieder herzustellen. (21). Die daraus entwickelten Produkte stellen eine alternative Therapie zum Ersatz von zerstörtem oder verletztem Körpergewebe dar. Bisherige Therapien, z.B. die allogene Organtransplantation, machen eine Immunsuppression notwendig und sind nur in begrenztem Maße verfügbar oder können langfristig versagen (z.B. xenogene Herzklappen) (22, 23).

Schon heute werden Ersatzmaterialien, die mit Techniken des Tissue Engineering hergestellt wurden, wie z.B. Haut und Knorpel, verwendet (23). Mittlerweile bleibt aufgrund des immer steigenden Bedarfs kein Organ von diesem Forschungsfeld ausgeschlossen (24).

Das Verfahren des Tissue Engineering stellt auch ein neues Konzept für einen biologischen Klappenersatz dar. Die „zelleigene Klappe“ wäre mit enormen Vorteilen für den Patienten verbunden: der Verzicht auf die Antikoagulantien, eine bessere Haltbarkeit sowie die unersetzliche Eigenschaft zur „potentiellen Selbstreparatur“ der

Klappe und der damit verbundene Verzicht auf Reinterventionen wäre hiermit gegeben. Das kann vielen Kindern mit kongenitalen Vitien der Herzklappen eine bessere und risikoärmere Therapie ermöglichen (25). Weiterhin ist die Matrix frei von Membranphospholipiden, da alle Zellen während des Dezellularisierungsvorgangs aus dem Gewebe entfernt wurden. Hierdurch wird ebenfalls die Bildung von Kalziumphosphatkristallen unterbunden und die damit verbundene Verkalkung der Herzklappen (26).

1.4 Perkutaner Pulmonalklappenersatz

Auf dem Gebiet des perkutanen Pulmonalklappenersatzes sind in der Vergangenheit viel versprechende Ergebnisse erzielt worden. Bereits im Jahre 2000 bewiesen Bonhoeffer et al. mit der ersten erfolgreichen Implantation bei einem zwölfjährigen Jungen die Durchführbarkeit dieses minimal invasiven Verfahrens (27). Zwei Jahre später berichtete wiederum die Gruppe um Bonhoeffer von sieben Kindern und einem erwachsenen Patienten mit signifikanter pulmonaler Regurgitation oder einer Obstruktion im rechtsventrikulären Ausflusstrakt, die transfemoral mit einer in einen Platinumstent eingenähten biologischen Klappe versorgt worden sind (28). Die auf diesem Gebiet führende Gruppe um Bonhoeffer präsentierte im Jahr 2005 abermals erfolgreiche Implantationen bei 58 Patienten. Es handelt sich hier in den meisten Fällen um Reinterventionen des rechtsventrikulären Ausflusstraktes bei jungen und erwachsenen Patienten mit Zustand nach operativer Korrektur einer Fallot-Tetralogie (29). Mit dieser Vorzeigestudie stellte die Gruppe ihren weltweiten Führungsanspruch auf dem Gebiet der perkutanen Implantation von klappentragenden Stents wiederholt unter Beweis.

Nichtsdestotrotz ist auch die von Bonhoeffer et al. eingesetzte Methode mit Schwierigkeiten verbunden und deshalb kritisch zu beurteilen. Die Gruppe verwendet einen Metallstent, der zusammen mit einem Ballon-in-Ballon Katheter an die gewünschte Position gebracht wird. Ist diese erreicht, werden die Ballons entfaltet und der Stent wird über den Druck von innen an den nativen Klappenannulus gedrückt. Hier ist die Aufrechterhaltung des Blutflusses während der Prozedur das Hauptproblem. Auch die Klappenprothese selbst wird durch den Ballon komprimiert und kann infolge dessen in der Funktion beeinträchtigt werden.

Wegen der genannten Unwägbarkeiten wird in dieser Arbeit anstelle des steifen und unelastischen Metallstents ein selbstexpandierender, flexibler Nitinol-Stent verwendet. Aufgrund jener Eigenschaft kann auf den Einsatz von Ballon-in-Ballon Kathetern verzichtet werden, sodass sich die Hämodynamik während der Prozedur vermutlich günstiger darstellt. Gleichzeitig werden die Klappentaschen nicht durch einen Ballon komprimiert, was eine Verbesserung der Langzeitergebnisse erwarten lässt.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel dieses Projekts ist die Herstellung einer ovinen, pulmonalen Herzklappe auf der Basis einer porcinen dezellularisierten Spendermatrix. Dieses Transplantat soll sowohl morphologisch als auch physiologisch einer nativen ovinen Pulmonalklappe entsprechen. Sie soll im Anschluss histologisch charakterisiert werden. Hierbei müssen die optimalen Besiedelungsbedingungen der verwendeten Zelltypen für das ovine Modell etabliert werden. Durch die Dezellularisierung soll ein Matrixprodukt entstehen, welches über einen längeren Zeitraum gelagert werden kann ohne sich morphologisch zu verändern, um bei Bedarf ein individuell an den Empfänger adaptiertes Transplantat im Bioreaktor herstellen zu können.

Folgende Fragen sollen im Einzelnen beantwortet werden:

- Ist eine vollständige Dezellarisierung einer porcinen Pulmonalklappe unter Erhalt der extrazellulären Matrixstruktur möglich?
- Ist eine Kultivierung von Zellen aus einer ovinen A. carotis möglich und lässt sich das lichtmikroskopisch nachweisen?
- Gelingt die *in vitro* Besiedelung azellulärer, porciner, klappentragender Nitinolstents mit ovinen, glatten Muskelzellen im Bioreaktor?
- Gelingt anschließend die *in vitro* Besiedelung mit ovinen Endothelzellen im Inkubator?

2.1 Material

2.1.1 Materialien für die Zellkultur

- T75-Flaschen (75 cm²) BD Biosciences
- T25-Flaschen (25 cm²) BD Biosciences
- 6 Lochplatten (1 well=9,6 cm²) Nunc A/S
- 24 Lochplatten (1 well=1,9 cm²) Nunc A/S
- Petrischalen (56,7 cm²) Nunc A/S
- Minisart-Filter 0,45 µm Satorius GmbH
- Glasflaschen 100ml Schott AG
- Mullkompressen steril 10x10cm Karl Beese GmbH&Co
- Mersilene geflochten 3/0 Ethicon
- OP-Abdecktuch 45x75cm Mölnycke Health care
- Pipetten 25 ml BD Bioscience
- Pipetten 10ml Greiner bio-one
- Pipetten 5 ml Greiner bio-one
- Zellkulturflaschen 25/75 cm² BD Biosciences
- Spritzen 2/5/10/20 ml Braun
- Einwegskalpelle Socorex
- Kanülen (gelb) Braun
- Kanülen (grün) Braun
- OP-Abdecktücher Walter CMP
- Nahtmaterial Prolene 6-0 und 7-0/0,7 metric Ethicon
- Nahtmaterial Mopylen, 6-0/0,7 metric Resorba
- Anatomische Pinzetten Klinikum UK S-H
- Chirurgische Pinzetten Klinikum UK S-H
- Präparierscheren Klinikum UK S-H
- Glasflasche Boro 100ml Klinikum UK S-H
- mikrochirurgische Federschere Klinikum UK S-H
- Nierenschale Klinikum UK S-H

2.1.2 Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur

- Collagenase A Roche Diagnostic
- Hank's Salt Solution Biochrom AG
- Medium 199 Eagle
(2,2 g/l NaHCO₃/Stable-glutamine) Biochrom AG
- DMEM (High glucose 4,5 g/L, mit
L-Glutamine, mit Sodium Pyruvate) PAA Laboratories GmbH
- PBS Puffer pH 7,2 Sigma Aldrich AG
- Cryo-SFM Promo Cell
- rFGF, Basic Human 25mg Promega
- Fetal Calf Serum (FCS) Biochrom AG
- Trypsin/EDTA Solution
(0,5%/0,02% in PBS) Biochrom AG
- Penicillin/Streptomycin (10³ µg/nL) Biochrom AG
- Gelatine from porcine skin, Typ A Sigma Aldrich Chemie GmbH

2.1.3 Antibiotika Lösungen

- Staphylex Injektion 1g Glaxo Smith Kline GmbH&CoKG
- Amphotericin B 50mg Bristol.Myers Squibb
GmbH&CoKGaA
- Metronizadol Deltaselekt 500mg Delta Select GmbH
- Piperacillin 2g Ratiopharm GmbH
- Refobacin 40mg Merck

2.1.4 Chemikalien und Materialien für die Hämalaun-Eosinfärbung

- Mayers Hämalaunlösung Merck
- Eosin G Merck
- Ethanol (vergällt) Büfa Chemikalien GmbH&Co
- Xylene J.T. Baker
- Eukitt (Eindeckmittel) PLANO

- Objektträger Histobon 75x25x1 mm Marienfeld
- Deckgläser 24x50mm Menzel-Gläser

2.1.5 Geräte

- Brutschrank Cell House 150 Heto
- Mikroskop ID 03 Zeiss Germany
- Sterile Werkbank (Bench)Lamina Air HB Heraeus
- Zentrifugen – Megafuge 20 R Heraeus
- Brutschrank Hera Cell 150 Heraeus
- Gefrierschrank -40 C° Liebherr
- Gefrierschrank Liebherr
- Kühlschrank Liebherr
- Präzisionswaage UMC 5 Sartorius
- Wasserbad – No. 10811890 Gesellschaft für Labortechnik
- Rüttler – Vf 2 Jahnke und Kunkel
- Bioreaktor JEN.meditec

2.2. Methoden

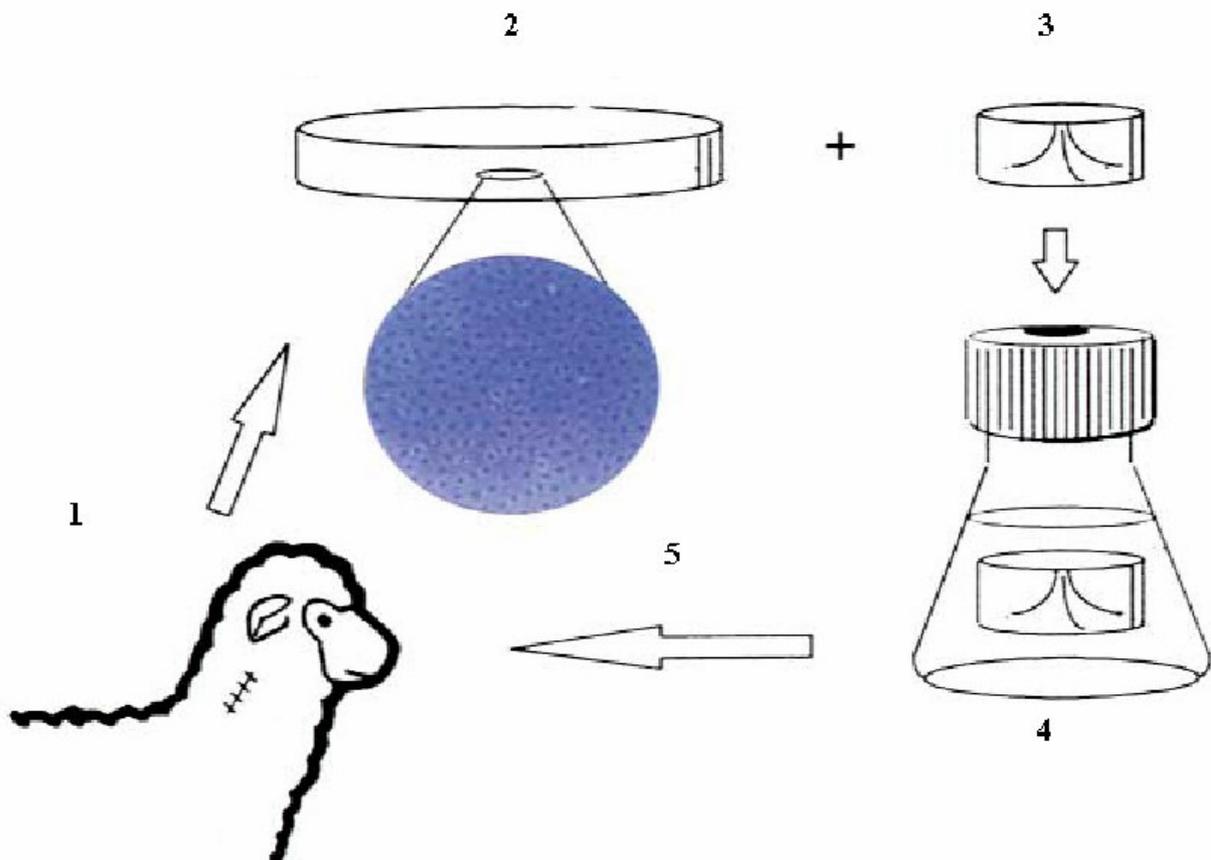


Abb. 2 (1-5): Das Konzept des Tissue Engineering am ovinen Modell in Einzelschritten
1. Entnahme der A. carotis vom Schaf; 2. Zellisolation und -anzucht; 3. Präparation einer porcinen Pulmonalklappe (PK); 4. *In vitro* Besiedelung der PK; 5. Perkutane Implantation der Klappe in das Schaf; Quelle: Stock et al 2001(30)

In diesem Kapitel sollen Vorgänge, die zur Herstellung eines tissue engineereden Stents von Bedeutung sind, beschrieben werden. Die anschließende perkutane Implantation und genaue *in vivo* Evaluation erfolgen in den nächsten Studien.

2.2.1 Zellgewinnung

Nach 24-stündiger Nahrungskarenz und Wasser *ad libitum* wurde das Tier mittels 5 – 10 mg/kg KG Ketamin intramuskulär prämediziert und in die Klinik transportiert. Dort wurde ein venöser Zugang am Ohr gelegt, über den es einen Bolus von 2 mg/kg KG und anschließend perfundiert Propofol mit einer Initialdosis von 12 – 14 mg/kg KG/h erhielt. Unter laryngoskopischer Kontrolle wurde ein Endotrachealtubus eingeführt. Das Schaf wurde zunächst manuell beatmet. Nach Anschluss des Beatmungsgerätes erhielt das Schaf 100% Sauerstoff bei einer Beatmungsfrequenz

von 12 – 15 Zügen pro Minute. Die Volumensubstitution erfolgte je nach Operationsverlauf individuell, jedoch wurden basal 20-30 ml/kg KG/h Ringerlösung *per infusionem* gegeben. Zur Narkoseerhaltung bekamen die Tiere zusätzlich zur Propofol-Infusion alle 20-30 min Ketaminboli von 50 mg. Im Verlauf der Operation wurde jedes Tier prophylaktisch mit 1,5 g Cefuroxim antibiotisch behandelt.

Anschließend wurde das Tier in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert, das EKG angeschlossen und eine Magensonde gelegt. Das Operationsgebiet wurde rasiert, gereinigt und mit Kodan (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert. Im weiteren Verlauf wurde dem Tier ein ca. 7 cm langes Stück der A. carotis operativ entnommen (Abb.2). Die Schnittstelle wurde zugenäht und die Anästhesie ausgeleitet, um danach das Tier zurück in den Stall zu bringen. Das entnommene Gefäß (Abb.3) wurde auf eine sterile Komresse gelegt und unter einer sterilen Werkbank mit einer Pinzette und Mikroschere vom überschüssigen Gewebe frei präpariert (Abb.4).



Abb. 3: Segment der A. carotis



Abb. 4: Entfernung von überschüssigem Gewebe

2.2.2 Isolation und Anzucht von ovinen Zellen

2.2.2.1 Isolierung der Endothelzellen

Zu Beginn wurde eine 0,2%-ige Collagenase A-Lsg. hergestellt, in der 0,01 g in 5 ml PBS gelöst und über eine Minisart (0,45 µm) steril filtriert wurden. Ein Loch einer 24 Lochplatte wurde mit 200 µl 0,1%-iger Gelatinelösung beschichtet.

Die Kopfkanülenspitze wurde mit DMEM befeuchtet, in das Gefäß gesteckt und mit Nahtmaterial fixiert. Die Arterie wurde über die Kanüle mit DMEM dreimal durchgespült, um Blutrückstände zu entfernen. Das eine Ende wurde zugeklemmt, die 0,2%-ige Collagenase A-Lsg. aufgezogen und in die Arterie gefüllt, bis sie sich leicht aufblähte. Die Kanüle wurde mit einem Knopf zugemacht und die gefüllte Carotis vorsichtig auf den Deckel einer Petrischale gelegt, mit dem Boden zugedeckt und bei 37°C, 5%CO₂ für 20 Minuten inkubiert. Danach wurde die Klemme entfernt und das Gefäß mit DMEM/FCS dreimal gespült, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die Flüssigkeit, in der sich die Endothelzellen befinden, wurde in einem 50 ml Falcon aufgefangen. Das alles wurde bei 1200 U/min für 4 Minuten zentrifugiert. Dann wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 1 ml DMEM/FCS resuspendiert, in das mit Gelatine-Lsg. vorbeschichtete Loch einer 24 Lochplatte gegeben und bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Sobald die 24 Lochplatte vollgewachsen war, wurden die Zellen auf eine 6 Lochplatte passagiert (s. u.). Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie in eine T25-Flasche überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte dann in T75-Flaschen, da eine größere Menge an Endothelzellen für eine Besiedelung benötigt wurde.

2.2.2.2 Isolierung der glatten Muskelzellen

Die Carotis wurde längs aufgeschnitten und die Innenseite des Gefäßes auf einer sterilen Unterlage trocken getupft, um die restlichen Endothelzellen zu entfernen. Aus dem aufgeschnittenen Gefäß wurden 1X1 cm große Stückchen geschnitten. Diese Stückchen wurden in die Petrischale gelegt und zwar mit der Innenseite nach unten. Danach wurden die Stückchen weiter in 1X1 mm Stücke geschnitten. Sie trockneten in der Petrischale an der Luft ca. 20-30 Minuten lang, bis sie eine bräunliche Farbe annahmen. Danach wurden 5-6 ml DMEM/FCS tropfenweise dazugegeben, so dass alle Stücke mit Medium bedeckt waren und nichts austrocknen konnte (Abb. 5). Man nahm so wenig wie möglich Medium, damit die Stücke nicht abschwimmen. Sie wurden vorsichtig in den Brutschrank gestellt und 7 Tage lang bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Sobald die Petrischale mit den glatten Muskelzellen zugewachsen war, wurden die Stücke vorsichtig entfernt und die Zellen in ein Loch einer 6 Lochplatte überführt. Später wurde genauso verfahren wie mit den Endothelzellen.

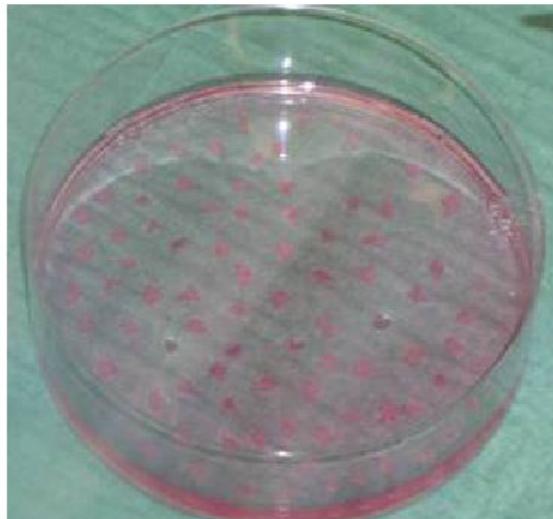


Abb.5: Gefäßstückchen im Medium

2.2.2.3 Passagieren von Zellen

Alle Flaschen und Platten wurden vor Gebrauch mit 0,1%-iger Gelatine-Lsg. beschichtet. Sie wurde aus 500 ml PBS und 0,5 g Gelatine hergestellt, bei 37°C erwärmt, bis die Gelatine gelöst war, und über einen Minisart steril filtriert. Der Boden der Platten oder Flaschen wurde danach mit der Lösung bedeckt und 30 min bei 37°C inkubiert. Vor dem Einfüllen der Zellsuspension wurde die Gelatine entfernt.

Vor dem Gebrauch wurden DMEM, PBS und Trypsin auf 37°C erwärmt. Das alte Medium wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Zur Überprüfung der abgelösten Zellen wurde eine Mikroskopkontrolle durchgeführt. Die Reaktion wurde mit doppelter DMEM-Menge beendet und die entstandene Suspension in ein Falcon (15 ml Falcon für Platten, 50 ml Falcon für Flaschen) überführt. Danach wurden die Zellen bei 1200 U/min 4 min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit DMEM resuspendiert und je nach Menge in Flaschen oder auf Platten aufgeteilt. Sie wurden bei 37°C, 5%CO₂ über Nacht inkubiert. Die Mengen der verwendeten Substanzen wurden in der Tab. 1 vorgegeben.

Tab.1 Menge für das Passagieren von Zellen verwendeter Substanzen

	Pro 10cm ² Bodenfläche ca. 1ml Gelatine; Beschichtung mit Gelatinelösung	Waschen PBS	Trypsin 37°C	Mit DMEM abstoppen	Mit DMEM resuspendieren
24 Loch (1,9 cm ²)	200 µl	500 µl pro well	200 µl	erst 1 ml dann noch 1 ml	1 ml
6 Loch (9,6 cm ²)	1 ml	1 ml	1 ml	3 ml	1 ml
T25 (25 cm ²)	2,5 ml	3 ml	2,5 ml	5 ml	10 ml
T75 (75 cm ²)	7,5 ml	10 ml	5 ml	15 ml	10 ml

2.2.3 Das Applikationssystem

2.2.3.1 Der Applikationskather

Für die erfolgreiche perkutane Stentimplantation wurde von unserer Arbeitsgruppe ein passendes Applikationssystem entwickelt und evaluiert. Aufgrund ihrer Ergebnisse wurde ein in unserem Labor modifizierter Katheter der Firma Medtronic, CA, USA ausgewählt. Dieser Katheter wurde zur Applikation aortaler Endoprothesen entwickelt und stammt aus dem „The Talent™ AAA Stent-Graft System“. Er hat eine Gesamtlänge von 156,5 cm und einen Außendurchmesser von 22 French (7,3 cm). Er besteht aus drei funktionell unterschiedlichen Abschnitten (Abb.6).

Am distalen Ende des Katheters befindet sich ein Raum, in dem der klappentragende Stent platziert und proximal durch einen sog. „Pusher“ begrenzt wird. Dies ist eine flexible Metallspirale, der ein Plastikkopf aufsitzt. Distal wird der Raum durch eine 6,5 cm lange, konisch geformte Olive begrenzt, welche aus weichem Silikon besteht. Am unteren Ende des Katheters befinden sich zwei Griffe. Der eine ist mit der äußeren aus durchsichtigem Plastik bestehenden Führungshülse verbunden, der andere mit dem sich in der Führungshülse befindlichen Pusher. Proximal an diesem Griff befindet sich noch ein Zulauf, über den eine Spülung des Systems ermöglicht wird.



Abb.6 (1-3) Medtronic Talent
(von distal nach proximal) **1.** Olive; **2.** Raum für den Stent; **3.** „Pusher“; **4.** äußere Führungshülse;
5. Griff mit Spülvorrichtung; **6.** Griff für den „Pusher“

Dieses Applikationssystem wurde in dieser Arbeit nur für den *in vitro* Entfaltungstest des Klappenstents benutzt.

2.2.3.2 Der Stent

Bei dem verwendeten Stent handelt es sich um ein Nitinolmodell der Firma Nitinol Devices & Components (Fremont, Kalifornien, USA) (Abb. 7). Dieser Stent besteht aus einer sogenannten Formgedächtnislegierung, einer intermetallischen Phase, die zu 55% aus Nickel und zu 45% aus Titan besteht.

Der Formgedächtniseffekt dieses Materials äußert sich in einer thermischen Komponente. Das Besondere an dieser Eigenschaft ist, dass sich der Stent (laut Hersteller in einem Rahmen von -25°C – 100°C) durch phasische Umwandlung an seine Umgebungstemperatur anpasst. Bei hohen Temperaturen dehnt er sich aus, bei Temperaturabfall zieht er sich zusammen. Für die praktische Anwendung bedeutet dies den Verzicht auf die Applikation mittels Ballonkatheter, da sich der Stent selbst expandiert (Abb. 8).

Die mechanische Komponente definiert sich als weitere maßgebliche Eigenschaft des Nitinolmaterials, nämlich eine extrem hohe Elastizität. Bis zu 10 % reversible Dehnung (Pseudoelastizität) kann mit diesem Material erzielt werden. Das sind bis zu zehnmal höhere Werte als bei konventionellen Bauteilen.

Des Weiteren zeichnet sich der Nitinolstent gegenüber anderen Bauteilen durch hohe Korrosionsbeständigkeit und gute Biokompatibilität aus.

Die Struktur des Stents basiert auf einer doppelreihigen Anordnung von 28 Rauten und ist in der Studie in den Durchmessern 19 mm- 24 mm verwendet worden.

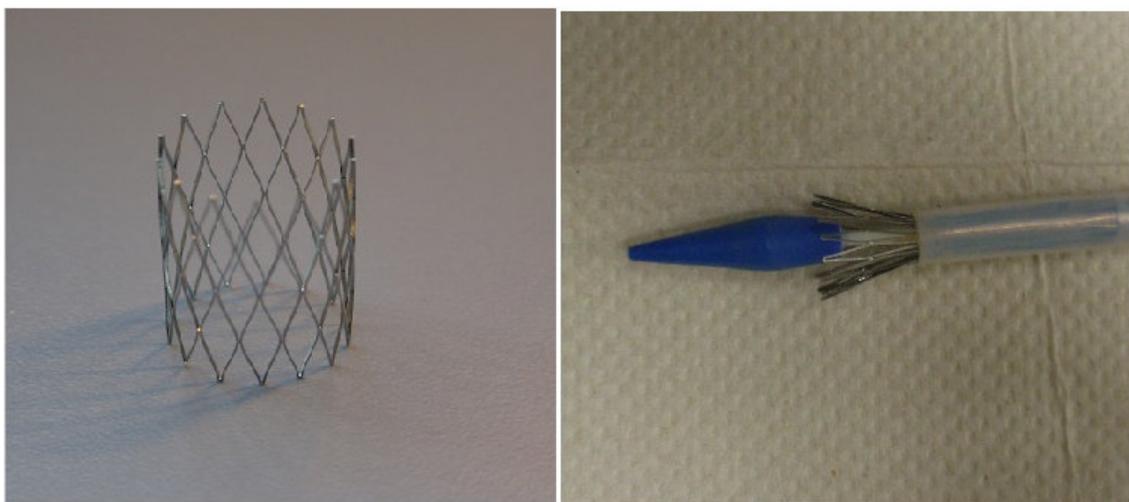


Abb. 7-8: Der selbst expandierende Nitinolstent

2.2.4.1. Präparation des ovinen Dünndarms

Um den Stent besser an den Blutstrom anzupassen und somit seine Blutdurchlässigkeit zu verringern, wurde er mit einer ovinen Dünndammatrix ausgekleidet und anschließend mit Einzelkopfnähten am Stent fixiert. Er wurde gründlich mit Leitungswasser gereinigt und sein Ende zugebunden. Mit Hilfe eines Trichters wurde der Darm mit Betaisodonna-Lsg. gefüllt und für 15 Minuten bei 4°C aufbewahrt. Nach Ablauf der Zeit wurde der Dünndarm mit ca.1,5 l sterilem PBS ausgewaschen und in 20 cm lange Stücke zurechtgeschnitten, je 2 davon kamen in 50 ml Röhrchen. Die Röhrchen wurden anschließend mit einer PBS/Antibiotika-Lsg. (7 ml Penecillin/Streptomycin + 500 ml PBS) befüllt und bei -30°C gelagert. Zur weitem Verarbeitung wurde ein Stück des Dünndarms aufgetaut (Abb.9) und längs aufgeschnitten, sodass die Mukosa leicht mit einem Skalpell abgetragen werden konnte (Abb.10). Die fertig präparierte Matrix wurde um den Stent gerollt (Abb.11) und dann für 2-3 Stunden in 100%-igen Alkohol eingelegt. Danach wurde die Matrix vorsichtig abgewickelt und dem Stent passend zugeschnitten (Abb. 12). Sie wurde in den Stent gebracht (Abb.13) und anschließend mit Einzelkopfnähten fixiert. Um das Austrocknen der Dünndammatrix zu vermeiden, muss der Dünndarm in kleinen Zeitintervallen angefeuchtet werden.



Abb. 9: Das aufgetaute Darmstück



Abb. 10: Abtragen der Darmmukosa



Abb. 11: Aufrollen des Darms um den Stent



Abb. 12: Zuschneiden des Dünndarms nach 2-stündiger Ethanol-Einwirkung



Abb. 13: Positionieren des Darms im Stent

2.2.4.2 Präparation einer porcinen Pulmonalklappe

Die Pulmonalklappe wurde aus einem frischen porcinen Herzen entnommen und für eine halbe Stunde in Betaisodonna-Lsg. bei 4-8°C eingelegt. Danach wurde sie mit einer isotonen NaCl-Lsg. durchgespült. Fett und Herzmuskulatur wurden manuell vorsichtig mit einer Mikroschere abgetragen, sodass durch die Klappentasche das „Pinzettenstativ“ zu sehen war (Abb. 14). Sobald die Pulmonalklappe fertig präpariert war, wurden drei Stege, mit Hilfe derer die Klappe am Stent fixiert wurde, aus der Gefäßwand geschnitten (Abb. 15). Die Dicke der Stege betrug ca. 1-2 mm (Abb. 16), um den Stent besser in den Katheter zu platzieren.



Abb. 14: Die Klappentasche auf einem „Pinzettenstativ“



Abb. 15: Präparation der Stege

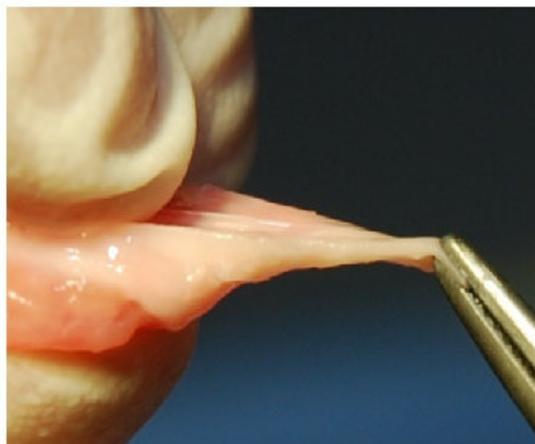


Abb. 16: Der fertige ca.1-2 mm dicke Steg

2.2.4.3 Einbringen der Pulmonalklappe in den Stent

Der Stent mit der Dünndarmmatrix wurde für eine Minute in eine isotone NaCl-Lsg. eingelegt, um sie aufzuweichen. Dann wurde die Pulmonalklappe (PK) in den Stent gelegt und mit Einzelkopfnähten so fixiert, dass die Stege ein gleichschenkliges Dreieck bilden (Abb. 17). Dadurch konnten sich die Taschen optimal entfalten.



Abb. 17: Eine im Stent eingenähte PK; die Stege bilden ein gleichschenkliges Dreieck

2.2.5 Dezellularisierung der Pulmonalklappe

Vor dem Dezellularisieren wurden 1 g Piperacillin in 10 ml aqua dest, 1 g Staphylex in 20 ml aqua dest und Amphotericin B in 20 ml aqua dest gelöst. In ein 200 ml Becherglas kommen 0,4 ml Gentamicin, 2 ml Piperacillin, 4 ml Staphylex, 8 ml Metronidazol und 4 ml Amphotericin und das Ganze wird dann mit PBS auf 200 ml aufgefüllt. Die eingenähte Pulmonalklappe wurde nun in 100 ml dieser PBS/Antibiotika-Lsg. für 24 Stunden bei 4°C gelagert. Danach wurde die Pulmonalklappe steril mit 100 ml PBS-Lsg. gespült und in ca. 80 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) für 12 Stunden eingelegt und bei 175 U/min und 37°C rotiert. Des Weiteren wurde die Pulmonalklappe steril mit 100 ml PBS-Lsg. gespült und in einer 100 ml PBS/Antibiotika-Lsg. eingelegt. Wieder wurde sie für 24 Stunden bei 175 U/min und 37°C inkubiert. Als letztes kam die Pulmonalklappe in eine sterile 100 ml Hank's-Lsg. und in dem Zustand war sie 5 Tage lang haltbar.

2.2.6 Die *in vitro* Besiedelung des klappentragenden Stents

2.2.6.1 Der Bioreaktor

Bei dem Bioreaktor (Abb.18) handelt es sich um ein computergesteuertes System. Durch einen Ventilmechanismus entstehen dabei zirkuläre, unidirektional gerichtete, pulsatile Fluss- und Druckkräfte (ca. 80 mmHg bei einer Frequenz von 1 Hz). Die auf diese Weise generierten, physikalischen Signale wirken auf die Klappen ein und stellen einen Proliferationsreiz für die glatten Muskelzellen dar. Dadurch wird eine gleichmäßige Migration der Zellen in das Klappengewebe bewirkt. Das Reaktorsystem kann komplett sterilisiert werden. Über die Zu- und Ableitung von einem CO₂-Luftgemisch und durch die Platzierung des Systems in einem Zellkulturschrank werden gleich bleibende Kulturbedingungen (37°C und 5% CO₂) sichergestellt.

Der Bioreaktor wurde von der Firma JEN.medice GmbH aus Jena entworfen und von Herrn Mück (Techniker am Schleiklinikum Schleswig) weiterentwickelt.



Abb.18: Der Bioreaktor mit zwei mit Medium gefüllten Glaskolben; die Stents sind im Kolben fixiert (Pfeile)

2.2.6.2 Die *in vitro* Besiedelung mit glatten Muskelzellen

Zuerst erfolgte die *in vitro* Besiedelung mit glatten Muskelzellen und dauerte 3-6 Tage. Es wurden mehrere Stents gleichzeitig besiedelt.

Vor Beginn der Besiedelung wurde ein Zellkulturmedium hergestellt, indem zu 500 ml DMEM 50 ml FCS, 7ml Penicillin/Streptomycin und 60 µl bFGF zugefügt wurden.

Für die Besiedelung eines Stents wurden ca. $2,5-3,0 \times 10^7$ Zellen verwendet. Das gewonnene Zellpellet wurde in 20 ml Kulturmedium gelöst. Unter sterilen Bedingungen wurde der dezellularisierte Stent in eine Petrischale gestellt und die Suspension mit den glatten Muskelzellen von innen und außen vorsichtig mit einer Pipette aufgebracht. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Der Stent wurde dann für 20 min in den Inkubator gestellt, damit die Zellen sich anhaften konnten. Danach wurden in eine 100 ml sterile Glasflasche 60 ml Medium vorgelegt und der zu besiedelnde Stent hineingestellt. Die Zellsuspension wurde nun langsam hinzupipettiert. Der Stent war vollständig vom Medium bedeckt. Das Ganze wurde nochmals für 30 min bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert und danach bei 25-30 U/min in schräger Lage rotiert. Diese Prozedur wurde in den nächsten Tagen wiederholt.

2.2.6.3 Einbau des Stents in den Bioreaktor

Der Einbau wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Abb.19). Am nächsten Tag wurde die Flasche mit dem Stent vom Rotor genommen und steril geöffnet. Der Stenthalter wurde angebracht, der Stent mit Stegen nach unten darin platziert und mit dem blauen Sicherungsring fixiert. Danach wurde er in die für ihn vorgesehene Öffnung im Bioreaktor eingebaut. Der Glaskolben und der Spiegel wurden eingebaut und mit 1l (2 x 500 ml) Zellkulturmedium bis zur Markierung befüllt. Der Bioreaktor wurde in den Glaskolben so eingeführt, dass der Stent oberhalb des Spiegels blieb. Die Glaskolbenhalterung wurde an den Bioreaktor angebracht, in den Brutschrank gestellt, der CO₂-Schlauch und Drucktransducer angeschlossen.

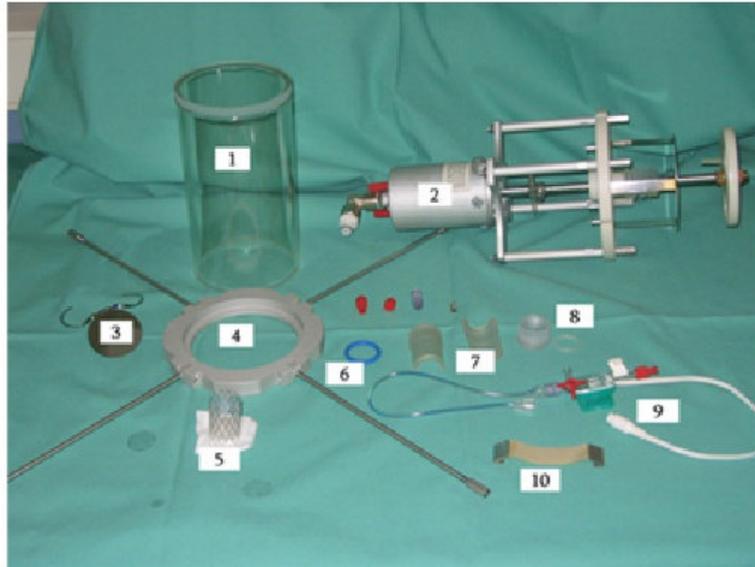


Abb. 19 (1-10): Bestandteile des Bioreaktors

1. Glaskolben; 2. Bioreaktor mit Rollmembranzylinder; 3. Spiegel; 4. Glaskolbenhalterung; 5. Stent; 6. blauer Sicherungsring; 7. Stenthalterung; 8. Stentdummy; 9. Drucktransducer; 10. Gummihalterung

2.2.6.4 Die *in vitro* Besiedelung mit Endothelzellen

Die *in vitro* Besiedelung mit Endothelzellen erfolgte an 4-5 aufeinander folgenden Tagen. Am ersten Tag wurden ca. $1,5-2,0 \times 10^7$ Zellen benötigt. Dieses Zellpellet wurde mit 20 ml Medium gelöst. Unter sterilen Bedingungen wurde der Stent in eine Petrischale gestellt und die Suspension mit den Zellen von innen und außen vorsichtig mit einer Pipette aufgebracht. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Der Stent stand danach für 20 min in Ruhe, damit die Zellen sich anhaften konnten. 60 ml Medium wurden in eine 100 ml sterile Glasflasche vorgelegt und der zu besiedelnde Stent hineingestellt. Die Zellsuspension wurde nun langsam hinzu pipettiert. Der Stent war vollständig vom Medium bedeckt. Das Ganze wurde nochmals für 30 min bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert und danach mit 25-30 U/min rotiert (Abb. 20). Am zweiten Tag wurde der Vorgang wiederholt. In den darauf folgenden zwei Tagen wurde der Rotor für eine Stunde gestoppt, damit die Zellen sich in Ruhe anhaften konnten. Am letzten Tag wurde die *in vitro* Besiedelung abgeschlossen und damit war der Stent zur Implantation bereit.

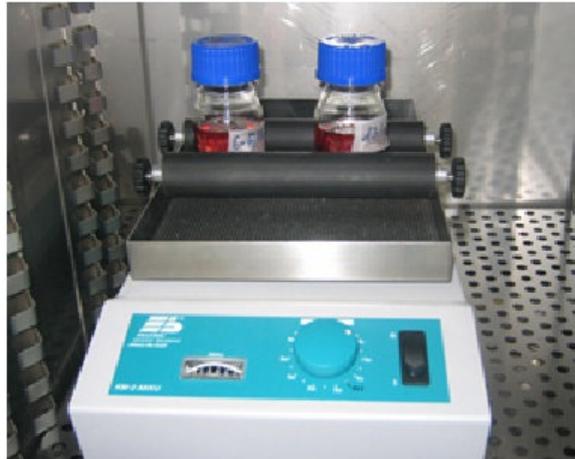


Abb. 20: Die statische Besiedelung mit Endothelzellen; Glasflaschen mit Stents auf einem Rotor

2.2.7 Färbung der Pulmonalklappentasche

2.2.7.1 Fixierung und Einbetten von Gewebeproben

Die Färbung der Pulmonalklappentasche erfolgte zur Verlaufskontrolle nach dem Dezellularisierungsvorgang und jedem Besiedelungsschritt. Vor der Färbung wurde der Stent für mindestens 24 h in 5%-iger Formalin-Lsg. fixiert. Danach wurde die Pulmonalklappe von Nähten gelöst, entnommen und in Paraffin eingebettet. Das Einbetten erfolgte in einer Einbettmaschine im Pathologischen Institut der Uni-Klinik Kiel über 45 h und 10 min.

- ◆ 2 x 70% ETOH bei 30°C je 3 h 30 min
- ◆ 2 x 96% ETOH bei 30°C je 3 h 30 min
- ◆ 4 x 100% ETOH bei 30°C je 3 h 30 min
- ◆ 3 x Xylol bei 30°C je 4 h
- ◆ 2 x in Paraffin bei 60°C je 4 h
- ◆ 1 x in Paraffin bei 60°C je 2 h

Zum Schluss wurden die Proben in Paraffinformen ausgegossen und in 5 µm dicke Schnitte geschnitten.

2.2.7.2 Die HE-Färbung an Paraffinschnitten

Zum Nachweis der erfolgreichen Dezellularisierung und der *in vitro* Besiedelung mit glatten Muskel- und Endothelzellen wurde eine HE-Färbung durchgeführt.

Die Paraffinschnitte wurden zuerst in Xylol (3 x 10 min) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 2 x 80%, 2 x 70% je 2 min) rehydriert. Danach wurden sie 5 min lang in *aqua dest* gewaschen und für 1 min in Mayers Hämalaun-Lsg. inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 20 min unter sauberem Wasser gebläut und zwei Minuten mit einer Eosin-Stamm-Lsg. (0,5% Eosin G + 0,25 ml Essigsäure) gefärbt. Dann wurden sie für zwei Sekunden in *aqua dest* eingetaucht und in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 2 x 100% je 30 sec) dehydriert. Die Schnitte wurden in Xylol (3 x 5 min) paraffiniert und in EUKITT eingedeckt. Anschließend wurden die gefärbten Paraffinschnitte histologisch untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung eines klappentragenden Stents

3.1.1 Präparation

Während der ganzen Arbeit wurden 44 Schweineherzen verwendet. 16 von ihnen wurden zu Übungszwecken benötigt, da drei wesentliche Probleme (Präparation, Fixierung im Stent und kathetergerechte Anpassung) die Herstellung der Pulmonalklappentragenden Stents erschwerten.



Abb. 21: Die herausgeschnittene porcine PK mit Herzgewebe



Abb. 22: Die fertig präparierte porcine PK

Zuerst wurde die Pulmonalklappe präpariert, ohne dabei ihre feinen Taschen zu beschädigen. Zur Präparation der nativen, porcinen Pulmonalklappe eigneten sich die Herzen von Schweinen aus der biologischen Zucht besser als aus der konventionellen, weil sie weniger Klappentaschendefekte aufwiesen. Das Herausschneiden der Klappe aus dem Herzen soll mit großem Aufgebot an umliegendem Gewebe erfolgen (Abb. 21), da die Klappentaschen in der aggressiven Betaisadonna-Lsg. beschädigt werden konnten. Die Wirkzeit der Lösung von 30 min wurde für optimal empfunden. Eine längere Desinfektionszeit führte zur Kumulation von Lösungsmitteln im Kollagengerüst der Klappe. Die Präparation der Klappe wurde manuell mit einer Mikroschere erfolgreich durchgeführt, ohne dabei die Taschen zu verletzen (Abb. 22)

Als Zweites wurde die Klappe in einen Stent fixiert, ohne dabei ihre physiologische Funktion zu beeinträchtigen. Es wurde festgestellt, dass Nahtmaterial Prolene 6/0 sich am besten zur Fixierung des ovinen Dünndarms und der Gefäßstege eignete.

Die Größe der Schweineherzen entsprach meistens nicht der Größe der Pulmonalklappen, sodass die Fixierung der Gefäßstege im Stent erschwert wurde. Große Klappentaschen wurden entweder leicht angeschnitten oder gefaltet, ohne ihre Funktion zu beeinträchtigen. Nachdem die Klappenstents fertig genäht waren, wurden sie kurz in einem Gefäß mit NaCl auf ihre Funktion und Suffizienz getestet (Abb. 23). Die Anatomie und Funktion der Klappentasche entsprach dem physiologischen Standard. Nur die stabil fixierten und suffizienten Klappen wurden weiter verwendet.

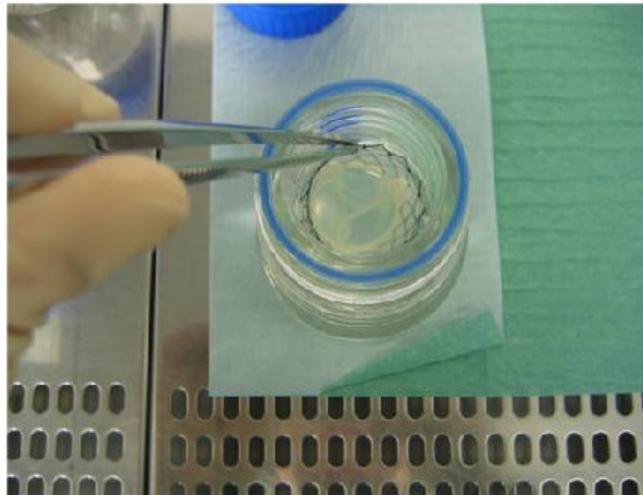


Abb. 23: Der Suffizienz-Test

Als Drittes wurde der fertige Stent an einen Applikationskatheter angepasst, ohne die Pulmonalklappe zu beschädigen. Um den Klappenstent besser im Katheter platzieren zu können, wurde die Dicke der Gefäßwand und der Stege auf 1-2 mm festgelegt. Dadurch konnten auch kleinere Katheter bei kleineren Tieren verwendet werden.

3.1.2 Dezellularisierung der Pulmonalklappe

Um die ursprünglichen Gefäßzellen der Pulmonalklappen zu entfernen, wurden diese mit Trypsin/EDTA dezellularisiert. Auf diese Weise entstand eine zellfreie Matrix, die zur Besiedelung mit ovinen Zellen verwendet werden konnte. Eine wichtige Aufgabe während des Dezellularisierungsprozesses bestand darin, die Zeit der Trypsinierung so festzulegen, dass die Struktur der Kollagenfasern nicht beschädigt wird. Nach wenigen Versuchen wurde die Zeit von 12 h für optimal empfunden, da eine längere Trypsinierung die Klappentaschen insuffizient machte (Abb. 24).

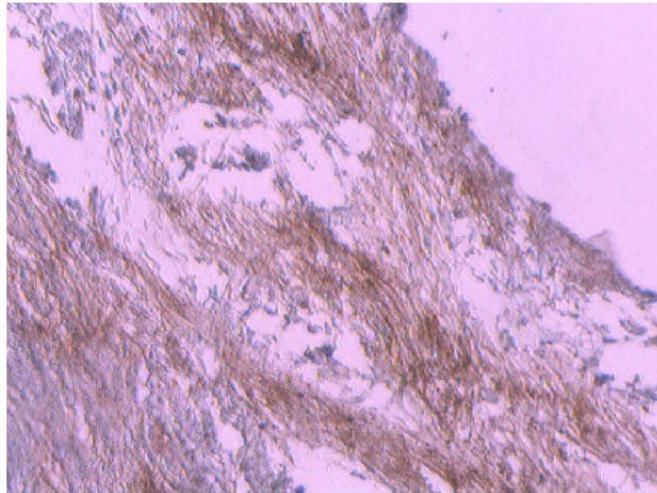


Abb. 24: Die Taschenklappe nach 24 h - Trypsinierung; HE-Färbung; 40x Vergrößerung. Teilweise aufgelöstes Kollagengrundgerüst, erschwelter Färbungsprozess.

3.1.3 Histologische Untersuchung einer dezellularisierten Pulmonalklappe

Um die Struktur der für 12 h dezellularisierten Klappentasche zu bewerten, wurde eine HE-Färbung angefertigt. Durch die Behandlung mit Trypsin/EDTA gelang eine nahezu vollständige Dezellularisierung der Herzklappen. Lediglich im Bereich des Herzmuskels waren noch vereinzelte Zellen und Zelltrümmer zu erkennen. Die Struktur der Taschen blieb weitgehend erhalten und zeichnete sich durch eine locker strukturierte Schicht aus. Man konnte leider keinen Unterschied zwischen zwei wesentlichen Schichten der Taschen (Spongiosa und Fibrosa) erkennen. In den Paraffinschnitten (Abb. 25) konnten keine Zellen in der Klappentasche mehr nachgewiesen werden. Die Quervernetzung der Kollagenfasern der extrazellulären Matrix war leicht verändert, jedoch noch deutlich zu erkennen (Abb. 26).

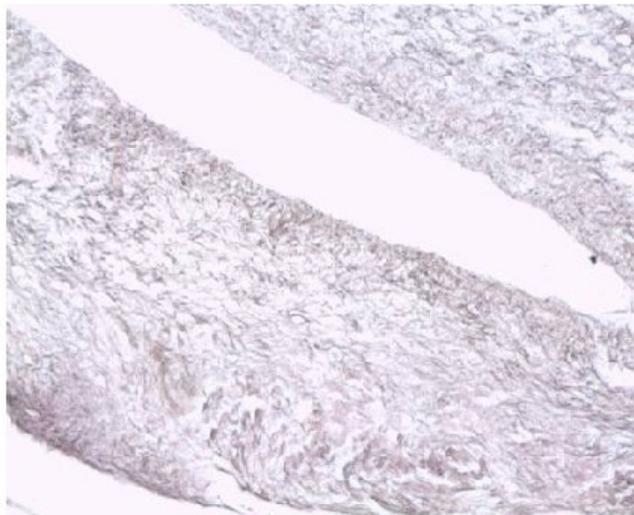


Abb. 25: Die dezellularisierte Taschenklappe; HE-Färbung; 10x Vergrößerung

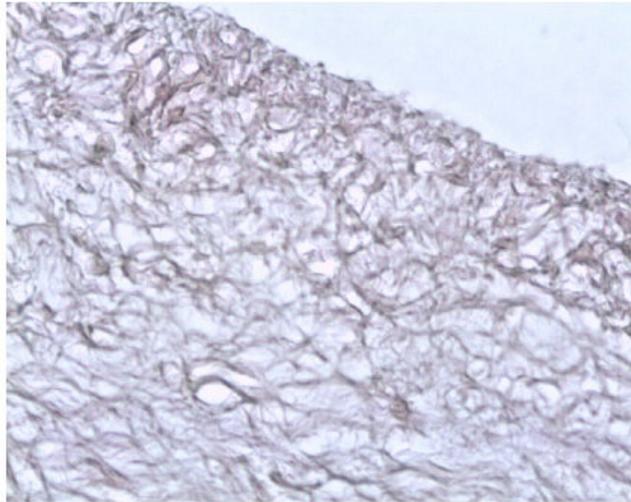


Abb. 26: Die dezellularisierte Taschenklappe; HE-Färbung, 40x Vergrößerung

3.2. Die Zellgewinnung und *in vitro* Besiedelung

Für die Gewinnung von Zellen zur Herstellung der Herzklappen wurde von jedem Versuchstier ein Segment der A. carotis unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Tiere überlebten in unseren Versuchsreihen die Prozedur problemlos.

3.2.1 Anzucht und Kultivierung von glatten Muskelzellen

Aus den 1X1 mm großen Gefäßwandstückchen auf den Petrischalen wuchsen nach fünf Tagen die ersten Zellen sternförmig aus, wie in Abbildung 27 gezeigt werden konnte. Das Zellwachstum wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert. Sobald eine große Anzahl der glatten Muskelzellen in der Petrischale nachgewiesen wurde (Abb. 28), wurden die Stücke vorsichtig entfernt und die Zellen auf eine 6 Lochplatte und danach in Kulturflaschen vermehrt. Die Anzuchtdauer der glatten Muskelzellen lag bei durchschnittlich 22 Tagen.

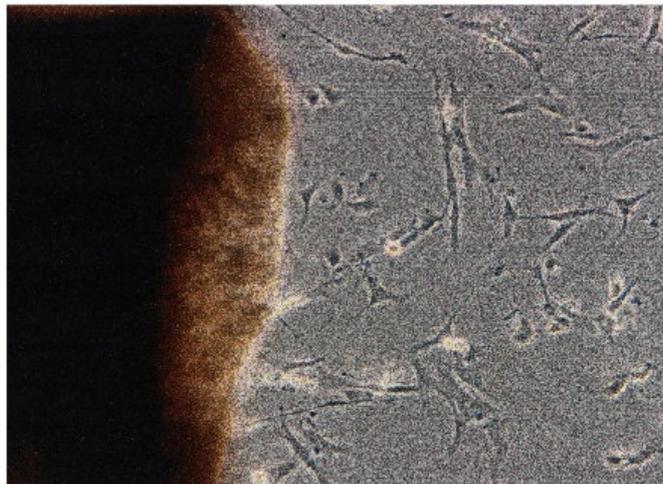


Abb. 27: Vereinzelte, glatte Muskelzellen nach 5 Tagen; 100x Vergrößerung

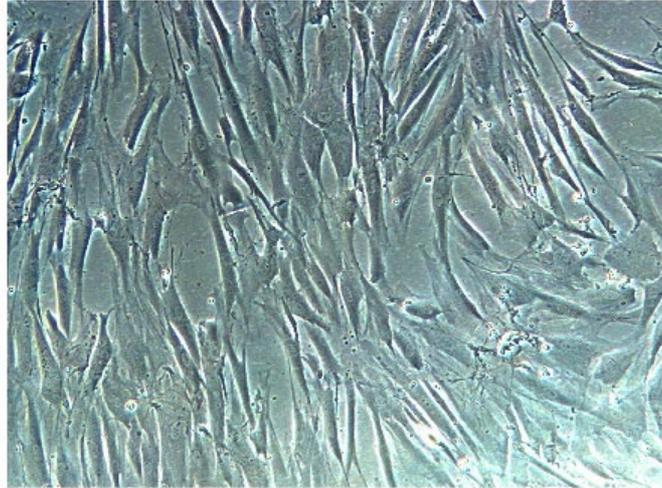


Abb. 28: Glatte Muskelzellen nach 22 Tagen; 100x Vergrößerung

3.2.2 Die *in vitro* Besiedelung mit glatten Muskelzellen

Die Besiedelung der Stents mit den glatten Muskelzellen erfolgte nach einem festgelegten Schema und betrug 6 Tage statischer und 16 Tage dynamischer Inkubation im Bioreaktor. Nach der Bioreaktor-Besiedelung konnten deutliche Zellnester mit Hilfe der HE-Färbung, in der Abbildung 29 blau, dargestellt werden. Die Fasern der extrazellulären Matrix selbst zeigten auch nach der Perfusion im Bioreaktor eine gute Quervernetzung und waren nicht aufgequollen.

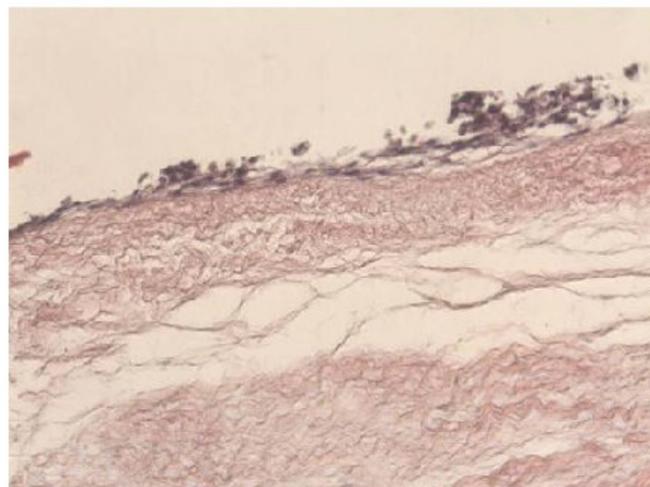


Abb. 29: Besiedelung mit glatten Muskelzellen; HE-Färbung, 10x Vergrößerung

3.2.3 Anzucht und Kultivierung von Endothelzellen

Nachdem die Petrischale mit Endothelzellen in den Inkubator gestellt wurde, wurden die ersten Kolonien von sich teilenden Zellen nach drei bis vier Tagen beobachtet (Abb. 30). Nach sieben bis acht Tagen bildeten die Zellen einen konfluenten Monolayer (Abb. 31), sodass sie auf eine 24 Lochplatte überführt werden konnten. Nach mehreren Passagen war die zur Besiedelung benötigte Anzahl an Zellen gezüchtet. Die Zeit zwischen den Passagen betrug jeweils fünf bis sechs Tage. Die Kulturzeit bis zu Besiedelung betrug hierbei ca. 26 Tage. Die Zellen zeigten sowohl zu Beginn, als auch zum Ende der Expansionsphase die typische tropfen- und spindelförmige Morphologie, sodass sie als Endothelzellen erkannt wurden.

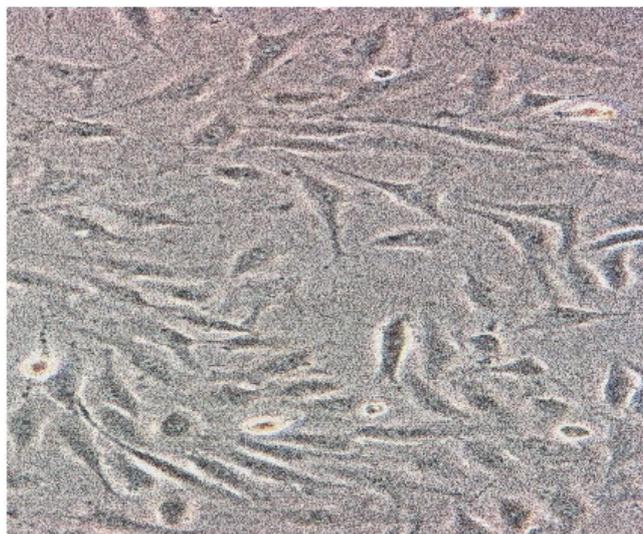


Abb. 30: Vereinzelte Endothelzellen nach 3-4 Tagen; 100x Vergrößerung

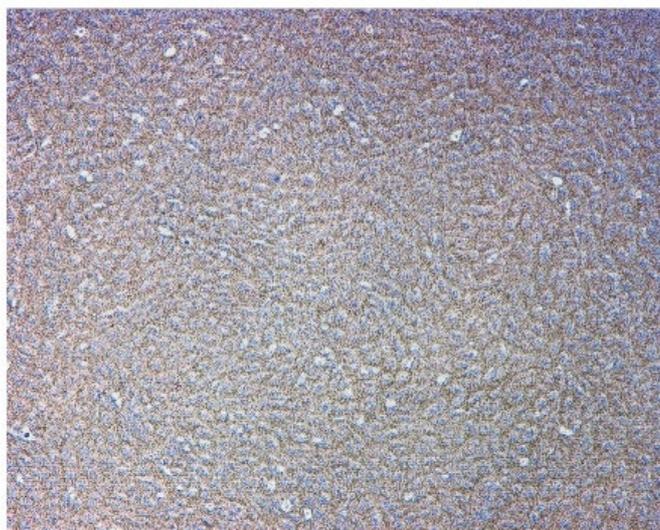


Abb. 31: Endothelzellen nach ca. 8 Tagen; 40x Vergrößerung

3.2.4 Die *in vitro* Besiedelung mit Endothelzellen

Die *in vitro* Besiedelung mit den Endothelzellen erfolgte direkt nachdem die Stents wieder aus dem Bioreaktor heraus waren und wurde im Inkubator durchgeführt. Sie betrug 4-5 Tage. Anschließend wurden die fertigen Stents mit HE-Färbung gefärbt und histologisch untersucht. In der Färbung der mit sowohl glatten Muskel- als auch Endothelzellen besiedelten Klappen konnten sowohl vereinzelte Zellnester als auch ein Zellmonolayer dargestellt werden (Abb. 32). Die extrazelluläre Matrix blieb erhalten und wies keine Veränderung ihrer Struktur auf.

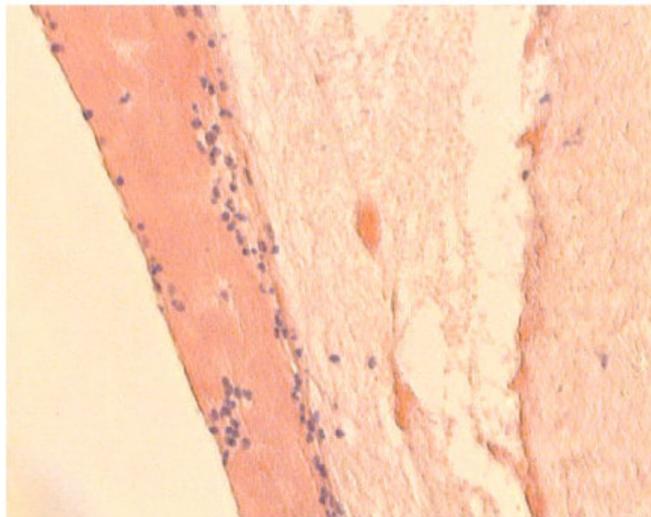


Abb. 32: Mit Endothel- und glatten Muskelzellen besiedelte Klappentasche;
HE-Färbung, 10x Vergrößerung

3.2.5 Vitalitätskontrolle

Sowohl die Endothel- als auch die glatten Muskelzellen wurden regelmäßig auf ihre Vitalität mittels einer Zellzählung kontrolliert. Die berechnete Zellzahl pro T75-Flasche lag nach einigen Passagen ca. zwischen $3,5$ und $5,8 \times 10^6$ Zellen.

Insgesamt wurden fünf glatte Muskelzell- und fünf Endothelzellkulturen angelegt. Die für die Besiedelung benötigte Zellzahl wurde durch Versuche der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stock auf jeweils acht T75 Kulturflaschen mit insgesamt jeweils ca. $2,5$ - $3,0 \times 10^7$ beider Zellgruppen festgelegt, wobei eine T75 Flasche mind. 3×10^6 Zellen beinhalten sollte.

3.3 Makroskopische Untersuchung der Klappentragenden Stents

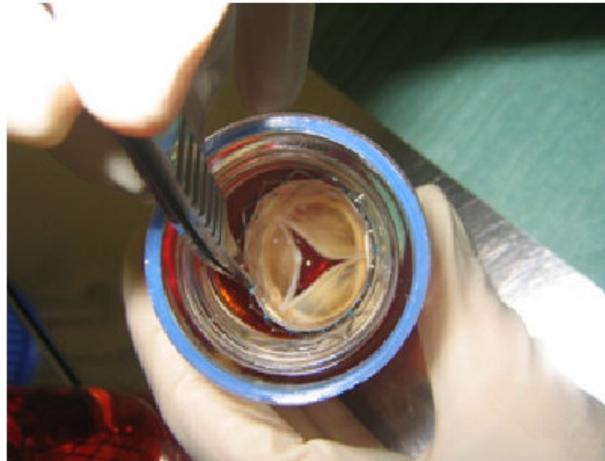


Abb. 33: Der besiedelte PK-Stent

Insgesamt wurden für diese Studie 28 Stents für den Einsatz am ovinen Modell gefertigt. Hierbei wurden zuerst Nitinol-Stents mit einem Durchmesser von 24 mm verwendet. Danach erfolgte eine Umstellung, wegen der kleinen Schafrgröße, auf 19 - 21 mm. Diese 28 Stents wurden anschließend dezellularisiert und mit autologen Zellen besiedelt. Nach der *in vitro* Besiedelung wiesen die Stents eine stabile Struktur auf. Die Klappentaschen waren der nativen Pulmonalklappe nahezu identisch und blieben suffizient (Abb. 33). Ihre Zusammen- und Entfaltungsfähigkeit wurde im Applikationskatheter überprüft (Abb. 34 und 35). Die Stents konnten zusammen gefaltet werden und passten problemlos in einen 22 French Katheter hinein. Nach der Entfaltung zeigten sie keinen makroskopisch auffälligen Schaden und wurden in ihrer Funktion nicht eingeschränkt. Die fertigen Stents wurden dann für die Implantationsversuche benutzt.



Abb. 34-35

Der Entfaltungsversuch:

Abb. 34: Der PK-Stent im Perkutankatheter;

Abb. 35: Der entfaltete PK-Stent

3.4. Zeitplan für die Herstellung eines Klappentragenden Stents

Um einen nahtlosen Übergang von der Präparation zur Besiedelung zu gewährleisten, wurde ein Zeitplan für die Herstellung eines tissue engineered klappentragenden Stents erstellt. Dieser Zeitplan wurde als Grundlage für weitere Versuchsreihen verwendet. Die Herstellung von *in vitro* besiedelten Stents fing mit der Entnahme der A. carotis und der Isolierung der ovinen Zellen an. Die anschließende Kultivierung sowohl der Endothel- als auch der glatten Muskelzellen dauerte 22 Tage. Für die Präparation und Fixierung von Klappe und Dünndarm wurden ca. vier Tage und für die Dezellularisierung zwei Tage eingeplant. Die *in vitro* Besiedelung erforderte noch mal 25 Tage. Insgesamt erstreckt sich der Herstellungsprozess von besiedelten klappentragenden Stents über ca. 53 Tage (Tab. 2).

Tab. 2: Zeitplan zur Herstellung eines klappentragenden Stents

Zellisolation/-kultivierung 22 Tage		glatte Muskelzellen 22 Tage		Endothelzellen 22 Tage	
Besiedelung 25 Tage		Statisch 6 Tage Dynamisch 16 Tage		Statisch 3	
Präparation 4 Tage	Pulmonalklappe 1 Tag	Dünndarmmukosa 1 Tag	Einnähen 1 Tag	Inkubation in AB-Lsg + PBS 24 h	
Dezellularisierung ca. 2 Tage	EDTA/Trypsin 12 h	AB-Lsg+PBS 24 h	Hank's-Lsg ca. 5 Tage haltbar		

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation sollte mittels Tissue Engineering *in vitro* ein pulmonalklappentragender Stent zur perkutanen Katheterimplantation am ovinen Modell hergestellt werden. Hierzu war es notwendig eine Methode für die Dezellularisierung von porcinen Pulmonalklappen zu etablieren. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Dezellularisierungsmethode, die bereits in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lutter und Prof. Dr. Stock (Universität Tübingen) am ovinen Modell mit Erfolg angewendet wurde. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Etablierung von einer geeigneten Besiedelungstechnik unter Verwendung eines Bioreaktorsystems. Sowohl die für die *in vitro* Besiedelung benötigten Zelltypen als auch die besiedelten klappentragenden Stents wurden histologisch charakterisiert.

4.1. Grundgedanke des Herzklappen-Tissue-Engineerings

Aufgrund einer immer größeren Diskrepanz zwischen benötigten Organen und vorhandenen Spenderorganen ist man heute auf Alternativen des Gewebeersatzes angewiesen. Daher gewann in den letzten Jahren der Organ- und Gewebeersatz unter Verwendung von Methoden des Tissue Engineering immer mehr an Bedeutung. Das Schlagwort „Tissue Engineering“ beinhaltet eine Vielzahl von Methoden zur Generierung funktionsfähiger biologischer Gewebe (30). Lutter und Stock et al. verbinden als erste Arbeitsgruppe den Forschungsbereich des Tissue Engineerings mit dem perkutanen Klappenersatz.

Folgendes Konzept des Tissue Engineerings wurde in dieser Arbeit favorisiert: Eine dezellularisierte Startermatrix wurde mit zuvor *in vitro* kultivierten und expandierten Zellen im Bioreaktor besiedelt. Ziel ist es, nach dieser *in vitro* Besiedelung eine xenogene Matrix zu erhalten, die nach Implantation durch die von den autologen Zellen synthetisierte, extrazelluläre Matrix ersetzt wird. Diese autologen Zellen sollen entsprechend ihrer physiologischen Funktion auch spätere Reparaturprozesse vornehmen. Nach einiger Zeit soll ein autologisiertes Gewebe im Organismus verbleiben, welches eine optimale Biokompatibilität aufweist und sämtliche Funktionen im Körper lebenslang übernehmen könnte. Weiterhin erlaubt es eine dynamische Anpassung an den Empfängerorganismus (30).

4.2. Die Dezellularisierung

Die optimale Dezellularisierungsmethode für unsere Versuche musste folgende Kriterien erfüllen:

1. Eine vollständige Entfernung sämtlicher Zellen und zellulärer Antigene aus der Matrix ist notwendig, um eine Transplantatabstoßung im Empfängerorgansimus zu vermeiden und um eine mögliche Degeneration durch Kalzifizierung auszuschließen (31, 32).
2. Die dreidimensionale Grundstruktur und die Quervernetzung des Kollagenetzwerkes sollen erhalten bleiben, um eine langfristige Funktionalität der Klappe zu gewährleisten.

Die von uns favorisierte, enzymatische Dezellularisierungsmethode mittels Trypsin und EDTA wurde bereits für Herzklappen etabliert. Viele Arbeitsgruppen verwendeten in ihren Studien Trypsin, doch einige von ihnen ohne Erfolg. Grauss und Mitarbeiter kamen bei Verwendung dieser Methode zur Dezellularisierung porciner Aortenklappen zu dem Ergebnis, dass eine vollständige Dezellularisierung nach 17-stündiger Inkubation in Trypsin nicht möglich war (33). Verglichen mit ihm erreichten Steinhoff und Mitarbeiter bei der Verwendung von Trypsin und einem längeren Inkubationsintervall von 48 h eine vollständige Dezellularisierung von ovinen Pulmonalklappen (34), während Kasimir und Mitarbeiter trotz Verlängerung des Inkubationsintervall auf 96 h keine vollständige Dezellularisierung porciner Aortenklappen erreichen konnten (35).

Die Dezellularisierungsversuche mit verschiedenen Inkubationszeiten in dieser Arbeit (12 und 24 h) konnten eine optimale Inkubationsdauer von 12 h bestätigen. Nach 24 h wies die Klappe Defekte auf und wurde dadurch insuffizient. Der Färbungsprozess verlief aufgrund der Klappengerüstinstabilität erschwert.

4.3. Einfluss der *in vitro* Besiedelung

Sowohl Matrixstrukturen synthetischen als auch biologischen Ursprungs sind initial meist thrombogen. Eine Möglichkeit zur Reduktion der Thrombogenität ist eine *in vitro* Besiedelung mit Endothelzellen, da diese in der Lage sind durch Sekretion von Mediatoren wie z.B. Prostacyclin, Protein-S oder TPA einer Thrombosierung aktiv entgegenzuwirken. Weiterhin nehmen sie durch Kommunikation mit anderen Matrixbestandteilen Einfluss auf den Aufbau der extrazellulären Matrix (36). In

klinischen Studien konnten Deutsch und Mitarbeiter die Reduktion der Thrombogenität ausgelöst durch die Endothelzellbesiedlung für arterielle Bypassgrafts beweisen. Sie erreichten Neun-Jahres-Offenheitsraten besiedelter PTFE-Grafts von 65 % gegenüber 16 % unbesiedelter Grafts (37).

Die Besiedelung von biologischen Materialien besitzt gegenüber den synthetischen Materialien den Vorteil, dass Limitationen, ausgelöst durch unvollständige Matrixumformung, umgangen werden. Weiterhin besteht keine Gefahr durch Degradationsprodukte (Kanzerogenität, Embolien) wie bei der Verwendung von biologisch abbaubaren Polymeren. Bei der Besiedelung einer Kollagenmatrix mit bovinen Endothelzellen und glatten Muskelzellen erhielten Weinberg und Mitarbeiter ein Konstrukt, welches keine ausreichende Stabilität aufwies und mit Polyesternetzen von außen stabilisiert werden musste (38). Diese Verstärkungen standen jedoch einer vollständigen Umformung und einer Vasoaktivität im Wege. Die weiteren Forschungen konzentrierten sich auf eine Verstärkung der Kollagenstruktur. Durch Dehydrierung wurde von Berglund et al. eine azelluläre Kollagensuspension in Röhrenstruktur gebracht und mit einer Suspension aus Kollagen und menschlichen Fibroblasten benetzt. Die sofortige Stabilität wurde durch die azelluläre Kollagenstruktur erreicht, eine weitere Zunahme durch Ausreifung der Zellen. Die Druckstabilität war jedoch geringer als die von nativen Gefäßen (39).

Durch die *in vitro* Besiedelung dezellularisierter Matrix werden die Limitationen bezüglich geringer initialer Stabilität, unvollständiger Matrixumformung und hoher Thrombogenität überwunden. Teebken und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die *in vitro* Besiedelungen von zuvor dezellularisierter, porciner Aortenmatrix mit humanen Endothelzellen und Myofibroblasten möglich ist und die biomechanische Stabilität erhalten blieb (40, 41). Bei der *in vitro* Besiedelung von dezellularisierten, porcinen Carotissegmenten mit autologen Endothelzellen und der Implantation am Schweinmodell konnten Teebken und Mitarbeiter zeigen, dass die Offenheitsraten dieser Segmente nach einem Monat mit 71 % signifikant höher lagen als die Offenheitsraten von implantierten Gefäßen aus einem biologisch abbaubaren Polymer (Polydioxanon; 0 % Offenheitsrate nach einem Monat) (42). Durch die in diesen Tierversuchen erzielten Ergebnisse führten wir eine *in vitro* Besiedelung von zuvor dezellularisierter, porciner Matrix mit ovinen glatten Muskel- und Endothelzellen durch.

4.4 Zellen für die *in vitro* Besiedelung

Eine erfolgreiche *in vitro* Besiedelung setzt voraus, dass genügend glatte Muskelzellen und Endothelzellen zur Verfügung stehen. Daher sind sowohl geeignete Zellquellen als auch Kulturbedingungen zur Expansion der Zellen notwendig.

Bisher konnten Zellen aus folgenden Geweben extrahiert werden: Arterien, Venen, Herzklappen, omentalem- und subkutanem Fett sowie tierexperimentell aus perikardialem Fett (43). Für die Auswahl des geeigneten Ausgangsgewebes wurde behauptet, dass die extrahierten Zellen möglichst den gewebetypischen Gefäßzellen entsprechen, da sich z.B. Endothelzellen unterschiedlicher Gewebe nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell voneinander unterscheiden (43).

In unserer Arbeit spielten sowohl der leichte operative Zugang als auch die initiale Zellausbeute eine wesentliche Rolle bei der Gefäßauswahl. Die Arbeitsgruppe von Stock et al. konnte in ihren Versuchen die Zellen aus der ovinen A. carotis erfolgreich isolieren. Ihre operative Erfahrung wurde in dieser Arbeit übernommen.

Alle unsere Tiere konnten problemlos die operative Gefäßentnahme überstehen und zeigten postoperativ in ihrem alltäglichen Leben keine Beeinträchtigungen.

Der nächste Grund für die Entnahme eines arteriellen Gefäßes war die initiale Gewinnung an glatten Muskelzellen, weil sie im venösen System eher geringer ausfällt (44).

4.4.1 Endothelzellextraktion

Uns standen zwei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: Die sog. Eversion, bei der die Arterie auf einem Edelstahlstab umgestülpt und anschließend in Enzymlösung inkubiert wurde, sowie die Kanülierung, bei der die Enzymlösung in die Arterie eingefüllt und diese anschließend mit Bulldogklemmen verschlossen wurde (45, 46). Da Bourke und Mitarbeiter zeigen konnten, dass die Kanülierung der Eversion hinsichtlich initialer Zellausbeute sowie dem Anteil vitaler Zellen überlegen war, verwendeten wir in unseren Versuchen diese Methode (47). Die Inkubation der Arterie erfolgte für 20 min in einer 0,2 %-igen Collagenase A-Lsg. Collagenase-A zeigte in verschiedenen Versuchsansätzen ideale Ergebnisse bei der Endothelzellextraktion (45, 48, 49). Weitere wichtige Einflussfaktoren auf die initiale Zellausbeute stellen die Inkubationszeit und die Konzentration der Enzymlösung dar. Eine geringe Inkubationszeit und eine geringe Konzentration des Enzyms führen zu

einer niedrigen, initialen Zellausbeute, während eine Verlängerung der Inkubationszeit und eine Erhöhung der Konzentration zu einer Abnahme der vitalen Zellen führt. Weiterhin lösen sich andere Zelltypen wie z. B. glatte Muskelzellen aus der Matrix (43). Tiwari und Mitarbeiter empfehlen eine Inkubationszeit zwischen 10 und 30 Minuten (43). Die von Teebken und Mitarbeitern verwendete Inkubationszeit von 20 Minuten, die gleichzeitig zu einer guten initialen Zellausbeute führte, wurde auch in unserer Arbeit verwendet (42).

4.4.2 Extraktion von glatten Muskelzellen

Zur Isolierung von glatten Muskelzellen verwendeten wir die erfolgreiche Methode von Zund et al. (50). Nach fünf Tagen konnten wir neben den im Medium inkubierten Gefäßstückchen die ersten Zellen beobachten. Im Vergleich zur Endothelzellanzucht dauerte die Gewinnung der glatten Muskelzellen länger und betrug durchschnittlich 22 Tage. Wie in den Versuchen von Zund et al. wurde die Zellisolierung und Kultivierung erfolgreich umgesetzt.

4.4.3 Expansion der Primärzellen

Für jede der folgenden *in vitro* Besiedelungen wurden $2,5-3 \times 10^7$ Endothel- und glatte Muskelzellen benötigt. Sowohl Zilla als auch Herring konnten zeigen, dass eine *in vitro* Besiedelung mit zu geringen Endothelzellzahlen keinen signifikanten Effekt auf die Thrombogenität und die Offenheit des Gefäßes hatte (48, 51). Erst eine Besiedelung mit höheren Zellzahlen erbrachte eine Abnahme der Thrombogenität und Zunahme der Offenheitsraten (52). Die glatten Muskelzellen sollten als interstitielle Zellen die extrazelluläre Matrix stabilisieren und die Adhäsion der Endothelzellen begünstigen (53). Die hohe Zellzahl konnte nur durch das Expandieren der extrahierten Zellen in Kultur erreicht werden. Die von uns festgesetzte Kulturzeit von 22 Tagen zeigte sich erfolgreich und wurde als Standard für weitere Kultivierungsversuche festgelegt.

4.5 Die *in vitro* Besiedelung im Bioreaktor

Das Ziel der *in vitro* Besiedelung im Bioreaktor war das Wachstum von Zellen durch mechanische Stimuli und physikalische Signale zu verbessern. Bei diesem Versuch haben wir uns auf die Arbeiten von Minuth et al. und Nerem et al. bezogen (54, 55). Ihre Ergebnisse ermutigten uns dazu ein Bioreaktorsystem zu entwickeln, in dem

unsere Klappenstents mit aufgebracht Zellen den pulsatilen Fluss- und Druckkräften ausgesetzt wurden. Dabei wurde eine funktionsspezifische Umgebung erschaffen, die den biologischen *in vivo* Verhältnissen ähnelte. Vor dem Einbau der Stents in den Bioreaktor wurden sie statisch mit glatten Muskelzellen besiedelt. Durch die 16-tägige Bioreaktorstimulation soll eine funktionsfähige, stabile Zellschicht am Klappengerüst entstehen, die später die Adhäsion von Endothelzellen ermöglichte. Mittels HE-Färbung konnten wir histologisch feststellen, dass die Bioreaktorstimulation von Zellen gut toleriert wurde.

Den Vergleich zwischen der dynamischen und statischen Besiedelung wagten in ihren Arbeiten Stock et al. und Schenke-Layland et al. (56, 57). Sie kamen zum Ergebnis, dass die dynamische Besiedelung einer porcinen Herzklappe durch Zunahme an Zellmasse, Kollagen und Elastin erheblich besser war als die rein statische Besiedelung.

Unsere nach der Bioreaktorbesiedelung erstellten histologischen Schnitte zeigten deutliche Zellnester an glatten Muskelzellen. Die darauf folgende statische Besiedelung mit Endothelzellen führte zu einer sichtbaren Zunahme an Zellmasse. Wir konnten leider keine Zelldifferenzierung vornehmen, da die HE-Färbung unspezifisch ist und eher einer Veranschaulichung als einer Beweisführung diene. Aber die Zellzunahme sprach für einen begünstigenden Einfluss der glatten Muskelzellen und der statischen Besiedelung auf die Endothelzelladhäsion.

4.6 Herstellung eines tissue engineereten Pulmonalklappenstents

Unsere durchgeführten, zahlreichen Versuchsschritte können grob in Präparation, Einbringung in den Stent, Zellkultivierung, Dezellularisierung und Besiedelung gegliedert werden. Einen besonderen Stellenwert in dieser Arbeit nahm der Versuch ein, einen effektiven Präparationsvorgang zu entwickeln. 44 porcine Pulmonalklappen wurden für Präparationsversuche verwendet. Da die Präparation und Fixierung des ovinen Dünndarms bis zur optimalen Umsetzung auch durch zahlreiche Versuche erarbeitet wurde, erforderte diese Arbeit ein gewisses, manuelles Können. Die Etablierung und Handhabung des Dezellularisationsverfahrens stellte sich unproblematisch dar. Auch die Zellkultivierung funktionierte und zeigte gute Ergebnisse. Die Einrichtung eines *in vitro* Besiedelungsvorganges konnte durch die Kooperation mit Stock et al. und dem von der Universität Jena entworfenen Bioreaktor schnell realisiert werden.

Die routinemäßige Herstellung erstreckte sich über ca. 53 Tage und war mit vielen Risiken behaftet, was natürlich eine Verlängerung der Versuche nach sich zog. Besonders die Isolierung, Kultivierung und Besiedelung von autologen Zellen stellten aufwendige Verfahren dar, die durch mögliche Fehler wie z.B. mangelnde Zellausbeute, fehlendes Wachstum und Kontaminierung schnell gefährdet waren. Zusätzlich war zu beachten, dass jedes Versuchstier zwei Operationen unterzogen werden musste, was für das einzelne Tier und damit auch für eine erfolgreiche Langzeituntersuchung ein Risiko darstellte. In jedem Arbeitsschritt, bis auf die der Präparation und Dezellularisierung, konnte bereits ein Fehler den gesamten Zyklus für ein Versuchstier gefährden. Aufgrund dieser Risiken war es umso wichtiger, die vielen Arbeitsschritte in einem konkreten zeitlichen Versuchsablauf zu strukturieren, um so zusätzliche Fehler zu vermeiden.

Mit unserem aufgestellten Zeitplan soll ein Gesamtüberblick verschafft werden, der einer ungefähren zeitlichen Versuchseinplanung dienen kann. Aufgrund hervorragender makroskopischer Ergebnisse konnte der in dieser Arbeit entworfene Arbeitsplan bereits als Versuchsprotokoll für die nachfolgenden Studien von Prof. Dr. Lutter eingesetzt werden.

4.7 Der Einsatz vom ovinen Dünndarm

In ihrer Arbeit untersuchten Stock und Lutter et al. die positive Auswirkung auf den Schutz der Klappe eines von innen mit ovinem Dünndarm ausgekleideten Stents (58). Hierfür wurden klappentragende Stents mit von innen angebrachtem Dünndarm gegenüber klappentragenden Stents mit von außen angebrachtem Dünndarm verglichen. Nach Kompression und Einsatz in einem Applikationskatheter wurden die Klappen histologisch und elektronenmikroskopisch analysiert. Die Klappen der von innen ausgekleideten Stents zeigten dabei im Gegensatz zu den von außen ausgekleideten Stents keine Schädigung des Gewebes.

Durch die erfolgreichen Versuche beider Arbeitsgruppen wurden die Stents von innen mit ovinem Dünndarm ausgekleidet. Nachdem die Dünndarmmukosa mit einem Skalpell entfernt wurde ließ sich der Dünndarm mittels NaCl und Ethanol sehr gut weiter verarbeiten und konnte problemlos fixiert werden. Nach einer Reihe kurzer Tests im Applikationskatheter wiesen die Stents keine Gewebeschädigung auf.

4.8 Ausblick

In dieser Dissertation konnte erfolgreich eine Dezellularisierungsmethode für porcine, pulmonalklappentragende Stents etabliert werden. Weiterhin konnte eine dezellularisierte Matrix erfolgreich mit ovinen Primärzellen *in vitro* besiedelt werden. Es konnte so ein pulmonalklappentragender Stent generiert werden, der die Grundlage für eine spätere, perkutane Implantation am ovinen Model darstellt. Die Ergebnisse der Besiedelungsexperimente verdeutlichen, dass das Verständnis der zellulären Mechanismen wie z.B. der Zell-Matrix-Interaktion von grundlegender Bedeutung ist. Vor einer humanen, klinischen Anwendbarkeit und einer kommerziellen Vermarktung eines pulmonalklappentragenden Stents müssen jedoch Studien durchgeführt werden, die die Funktionalität des Endothels im klappen-tragenden Stent untersuchen.

In Zukunft werden vermehrt alternative Zelltypen im Bereich des Tissue Engineering Anwendung finden. Bisher wurden neben den primären Endothelzellen, embryonalen Stammzellen und endothelialen Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut oder Knochenmark für das Tissue Engineering verwendet.

Stammzellen vertreten eines der viel versprechendsten Gebiete in der biologischen und medizinischen Forschung. Alle Stammzellen besitzen zwei grundlegende Eigenschaften: Unbegrenzte Selbsterneuerung und das breite Potenzial sich zu Zellen aller Gewebetypen zu differenzieren. Die Arbeit von Xiao et al. zeigte, dass durch bestimmte Enzyme (z.B. SRF und Myokardin) eine *in vitro* Differenzierung der Stammzellen zu glatten Herzmuskelzellen möglich ist (59). Um nicht in einen Konflikt mit der Ethik-Kommission und dem Gesetz zu geraten, werden meist adulte Stammzellen zu Forschungszwecken benutzt. Da sie wenig verfügbar sind und geringes Differenzierungspotenzial besitzen, ist die Nutzung der adulten Stammzellen begrenzt.

Knochenmarkszellen kamen schon in einer in Japan veröffentlichten Studie zur Anwendung: Biologisch abbaubare Polymere wurden mit diesen Zellen besiedelt und anschließend in die V. cava inf. im Hund implantiert. Histologisch konnte nach Explantation eine vollständige Endothelialisierung der Segmente nachgewiesen werden (60). Ein Vorteil der Knochenmarkszellen ist die Möglichkeit, diese durch eine günstige Expansionsphase im Labor zu verwenden. Zur Gewinnung der Zellen wäre jedoch eine Knochenmarkspunktion notwendig.

Verglichen hierzu wäre für die Verwendung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Blut nur eine Blutentnahme notwendig (61, 62). Bedingt durch dieses wenig invasive Verfahren würde die Akzeptanz unter den Patienten steigen. Vor einer Anwendung der Vorläuferzellen müssen jedoch nach ersten viel versprechenden Ergebnissen die genauen, zellulären Mechanismen, die zu einer Differenzierung dieser pluripotenten Zellen in den benötigten Zelltyp (Endothelzellen) führen, eingehend untersucht werden (62, 63).

Durch die neusten Laborversuche der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lutter und Dr. rer. nat. Metzner wurden endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark gewonnen.

Eine tissue engineerte Pulmonalklappe, die sich perkutan implantieren lässt und zusätzlich ein Regenerationspotenzial besitzt, würde neue Therapieoptionen eröffnen. Besonders die (Re)Operationsmöglichkeiten und -indikationen kongenitaler Vitien könnten erweitert werden (63, 64). Auch für reine Forschungszwecke und Tierversuchsreihen bietet die Verbindung von Tissue Engineering mit perkutanen Applikationsmethoden neue Möglichkeiten. Da tissue engineerte Herzklappen mit perkutanen Verfahren ohne extrakorporale Zirkulation implantiert werden können, ermöglicht das eine schnelle Versuchsdurchführung.

In welche Richtung sich das Tissue Engineering von Klappenstents entwickelt hängt einerseits von den Rahmenbedingungen wie einer einheitlichen Gesetzgebung bezüglich Produktion und Zulassung, andererseits von einem genauen Verständnis der zellulären Mechanismen, wie z.B. der Zell-Matrix-Interaktion und nicht zuletzt von der Kosten-Nutzen-Relation der resultierenden Implantate ab.

5. Zusammenfassung

Einleitung. Die Verwendung biologischer oder mechanischer Prothesen zum Ersatz erkrankter oder geschädigter Herzklappen ermöglicht eine weitgehende Wiederherstellung der Klappenfunktion. Jedoch verfügt keines der derzeit verwendeten Klappenmodelle über eine ausreichende, längerfristige Biokompatibilität. Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung eines autologen Pulmonalklappenstents auf der Basis eines Xenografts zur späteren perkutanen Implantation am ovinen Modell. Ein viel versprechendes Konzept zur Herstellung eines solchen Klappenstents ist die *in vitro* Konditionierung dezellularisierter und mit ovinen Gefäßzellen besiedelte Pulmonalklappen vom Schwein.

Methoden. Die zur *in vitro* Besiedlung benötigten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen wurden aus einem Segment der A. carotis des jeweiligen Versuchstieres gewonnen. Die porcinen Pulmonalklappen wurden mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lsg dezellularisiert und mit den gewonnenen, glatten Muskelzellen zwei Tage unter statischen Bedingungen besiedelt. Anschließend wurden die Klappen 16 Tage in einem Bioreaktorsystem den pulsatilen Scherkräften ausgesetzt. Eine nachfolgende 2-tägige Kulturphase unter statischen Bedingungen, in der die Endothelzellen aufgebracht wurden, komplettierte die *in vitro* Besiedelung. Die fertigen Klappenstents wurden anschließend durch makroskopische Beurteilung und Histologie in Bezug auf ihre zellulären und extrazellulären Strukturen charakterisiert.

Ergebnisse. Bei der makroskopischen Beurteilung wiesen die Klappenstents keine Beschädigungen sowohl nach der Dezellularisierung und Besiedelung als auch nach dem Entfaltungsversuch im 22 French Katheter auf. Die Stents öffneten und schlossen sich regelrecht. Bei der histologischen Evaluation mittels einer HE-Färbung wurden nach der Dezellularisierung keine Zellen nachgewiesen. Nach der Besiedelung mit ovinen Zellen waren deutliche Zellnester und keine Schädigung der extrazellulären Matrix erkennbar.

Schlussfolgerung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Herstellung eines autologen Pulmonalklappenstents auf der Basis eines Xenografts entwickelt. Die verwendeten Materialien und Geräte erwiesen sich als effektiv. Der Pulmonalklappenstent konnte erfolgreich besiedelt werden und blieb während des gesamten Prozesses funktionstüchtig. Die perkutane Implantation und genaue *in vivo* Evaluation sollen demnächst in nachfolgenden Studien erfolgen.

6. Literaturverzeichnis

1. Boon A, Cheriex E, Lodder J, Kessels F. Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve. *Heart*. 1997 November; 78(5): 472–474
2. Soler-Soler J., Galve E. Worldwide perspective of heart valve disease. *Heart* 2000; 83(6): 721-725
3. Victor O. Morell, Jeffrey P. Jacobs and James A. Quintessenza. Aortic translocation in the management of transposition of the great arteries with ventricular septal defect and pulmonary stenosis: results and follow-up. *Ann Thorac Surg* 2005; 79: 2089-2093
4. Hufnagel C.A. Aortic plastic valvular prostheses. *Bull Georgetown Univ Med Center* 1951; 5: 128-130
5. Cohn L.H, Allred E.N, DiSesa V.J, Sawtelle K, Shemin R.J, Collins J.J Jr. Early and late risk of aortic valve replacement. A 12 year concomitant comparison of porcine bioprosthetic and tilting disc prosthetic aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1984; 88(5 Pt 1): 695-705
6. Hume M, Chan Y.K. Examination of the blood in the presence of venous thrombosis. *JAMA* 1967; 200(9): 747-750
7. Casselman F.P, Bots M.L, Van Lommel W, Knaepen P.J, Lensen R, Vermeulen F.E.E. Repeated thromboembolic and bleeding events after mechanical aortic valve replacement. *Ann Thorac Surg* 2001; 71(4): 1172-1180
8. Murray G. Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology* 1956 Oct; 7(5): 466–471
9. Bentall H.H, De Bono A. A technique for complete replacement of the ascending aorta. *Thorax* 1968 Jul; 23(4): 338–339
10. Ross D.N. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 1962; 2(7254): 487
11. Barratt-Boyes B.G. Homograft valve replacement for aortic valve disease. *Thorax* 1965; 20(6): 495-504
12. Shaddy R.E, Hawkins J.A. Immunology and failure of valves allografts in children. *Ann Thorac Surg* 2002; 74(4): 1271-1275
13. Horowitz M.S, Goodman D.J, Fogarty T.J, Harrison D.C. Mitral valve replacement with the glutaraldehyde-preserved porcine heterograft. Clinical, hemodynamic and pathological correlations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1974; 67(6): 885-895

14. Rothkopf M, Davidson T, Lipscomb K, Narahara K, Hillis L.D, Willerson J.T, Estrera A, Platt M, Mills L. Hemodynamic evaluation of the Carpentier-Edwards bioprosthesis in the aortic position. *Am J Cardiol* 1979; 44(2): 209-214
15. Magilligan D.J, Lewis J.W, Jara F.M, Lee M.W, Alam M, Riddle J.M, Stein P.D. Spontaneous degeneration of porcine bioprosthetic valves. *Ann Thorac Surg* 1980 30(3): 259-266
16. Oyer P.E, Miller D.C, Stinson E.B, Ritz B.A, Moreno-Cabral R.J, Shumway N.E. Clinical durability of the Hancock porcine bioprosthetic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980; 80: 824-833
17. Camillieri J.P, Pornin B, Carpentier A. Structural changes of glutaraldehyde-treated porcine bioprosthetic valves. *Arch Pathol Lab Med* 1982; 106: 490-496
18. Kutsche L.M, Oyer P, Shumway N, Baum D. An important complication of Hancock mitral valve replacement in children. *Circulation* 1979; 60: 98- 103
19. Geha A.S, Hillel L, Stansel H.C, Cornhill J.F, Kilman J.W, Buckley M.J, Roberts W.C. Late failure of porcine valve heterografts in children. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1979; 78: 351-64
20. Sanders S.P, Levy R.J, Freed M.D; Norwood W.I, Castaneda A.R. Use of Hancock porcine xenografts in children and adolescents. *Am J Cardiol* 1980; 46(3): 429-438
21. Skalak R and Fox C.F, eds. *Tissue Engineering, Proceedings for a Workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988*, Alan Liss, New York
22. Bock A.K, Ibarreta D, Rodriguez-Cerezo E. Human tissue-engineered products- Today's markets and future prospects. *European Communities: Institute for Prospective Technological Studies*; 2003
23. Shieh S.J, Vacanti J.P. State-of-the-art tissue engineering: From tissue engineering to organ building. *Surgery* 2005 Jan; 137(1): 1-7
24. Stock U.A, Vacanti J.P, Hazekamp M.G, Kurvers M.M.J, Schoof P.H, Vliegen H.W, Mulder B.M, Roest A.A.W. Tissue Engineering: current state and prospects. *Ann Rev Med* 2001; 52: 443-451
25. Ottenkamp J, Dion R.A.E. Pulmonary valve insertion late after repair of Fallot's Tetralogy. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2001; 19(5):667-670
26. Goldstein, Steven, Atlanta US, Black, S., Acworth US. Gewebedezellularization. Dokumentidentifikation: DE69827001T2 PatentDe, 08.09.2005

27. Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Saliba Z. Percutaneous insertion of the pulmonary valve in a right-ventricle to pulmonary artery prosthetic conduit with valve dysfunction. *Lancet* Oct 2000; 356: 1403-1405
28. Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Qureshi S.A. Percutaneous insertion of the pulmonary valve. *J. Am. Coll. Crdiol* 2002; 39(10): 1664-1669
29. Khambadkone S, Coats L, Taylos A, Boudjemline Y, Derrick G, Tsang V, Cooper J, Mthurangu V, Hedge S.R, Razavi R.S, Pellerin D, Deanfield J, Bonhoeffer P. Percutaneous Pulmonary Valve Implantation in Humans, Results in 59 consecutive patients. *Circulation*. 2005; 112: 1189-1197
30. Stock U.A, Vacanti J.P. Tissue Engineering: current state and prospects. *Ann Rev Med* 2001; 52: 443-451
31. Iyengar A.K.S, Sugimoto H, Smith D.B, Sacks M.S. Dynamic in vitro quantification of bioprosthetic heart valve leaflet motion using structured light projection. *Ann Biomed Engineering* 2001; 29(11): 963-973
32. Hopkins R.A, Jones A.L, Wolfinbarger L, Moore M.A, Bert A.A, Lofland G.K. Cardiac Decellularization reduces calcification while improving both durability and 1-year functional results while improving both durability homograft valves in juvenile sheep. *J Thorac Cardivasc Surg*. 2009; 137(4): 907-913
33. Grauss R.W, Hazekamp M.G, Oppenhuizen F, van Munsteren C.J, Gittenberger-de Groot A.C, DeRuiter M.C. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves:matrix changes due different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 27(4): 566-571
34. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss R.R. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: In vivo restoration of valve tissue. *Circulation* 2000; 102 (19 Suppl 3): 50-55
35. Kasimir M.T, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs* 2003; 26(5): 421-427
36. Lanza R.P, Langer R, Vacanti J.P. Principles of Tissue Engineering. 2.Auflage. San Diego u.a.: Academic Press; 2004
37. Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery* 1999; 126(5): 847-55

38. Weinberg C.B, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 1986; 231 (4736): 397-400
39. Berglund J.D, Mohseni M.N, Nerem R.M, Sambanis A. A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs. *Biomaterials* 2003; 24(7): 1241-1254
40. Teebken O.E, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; 19(4): 381-386.
41. Teebken O.E, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. Ein neues Konzept für Ersatzmaterialien in der Gefäßchirurgie [A new concept for substitutes in vascular surgery]. *Langenbecks Arch Chir Suppl* 1998; 115: 1256-1259.
42. Teebken O.E, Pichlmaier A.M, Haverich A. Cell seeded decellularised allogeneic matrix grafts and biodegradable polydioxanone-prostheses compared with arterial autografts in a porcine model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 22(2): 139-145.
43. Tiwari A, Salacinski H.J, Hamilton G, Seifalian A.M. Tissue engineering of vascular bypass grafts: role of endothelial cell extraction. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 21(3): 193-201.
44. Pätzold R.: Adaptation von statisch kultivierten Endothelzellen auf PU-Prothesen an Scherkräfte in vitro. *Med. Diss.* 2007, Seite 50, München
45. Watkins M.T, Sharefkin J.B, Zajtchuck R. Adult human saphenous vein endothelial cells: assessment of their reproductive capacity for use in endothelial seeding of vascular prostheses. *J Surg Res* 1984; 36(6): 588-596
46. Graham L.M, Vinter D.W, Ford J.W. Cultured autogenous endothelial cell seeding of prosthetic vascular grafts. *Surg Forum* 1979; 30: 204-206
47. Bourke B.M, Roche W.R, Apfelberg M. Endothelial cell harvest for seeding vascular prostheses: the influence of technique on cell function, viability and number. *J Vasc Surg* 1986; 4(3): 257-263
48. Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Fischlein T, Minar E, Hammerle A. Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report. *J Vasc Surg* 1987; 6(6): 535-541
49. Zilla P, Fasol R, Preiss P. Use of fibrin glue as a substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts. *Surgery* 1989; 105(4): 515-522

50. Zund G, Pretre R, Niederhauser U, Vogt P.R, Turina M.I: Improved exposure of the pulmonary arteries for thromboendarterectomy. *Ann. Thorac. Surg.* 1998; 66: 1821- 1823
51. Herring M, Smith J, Dalsing M. Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene femoral popliteal bypasses: the failure of low density seeding improve patency. *J Vasc Surg* 1994; 20(4): 650-655
52. Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery* 1999; 126(5): 847-55
53. Wu X, Rabkin-Aikawa E, Guleserian K.J, Perry T.E, Masuda Y, Sutherland F.W, Schoen F.J, Mayer J.E, Jr., Bischoff J.: Tissue-engineered microvessels on threedimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(2): 480-487
54. Minuth W.W, Schumacher K, Strehl R, Kloth S.: Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000; 11(5): 495-522
55. Nerem R.M, Seliktar D.: Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 2001; 3: 225-243
56. Schenke-Layland K, Opitz F, Gross M, Doring C, Halbhuber K.J, Schirrmester F, Wahlers T, Stock U.A.: Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an in vitro study. *Cardiovasc Res* 2003; 60(3): 497-509
57. Stock U.A, Nagashima M, Khalil P.N, Nollert G.D, Herden T, Sperling J.S, Moran A, Lien J, Martin D.P, Schoen F.J: Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000; 119: 732-740
58. Stock U.A, Degenkolbe I, Attmann T, Schenke-Layland K, Freitag S, Lutter G.: Prevention of device-related tissue damage during percutaneous deployment of tissueengineered heart valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2006; 131: 1323-1330
59. Xiao Q, Wang G, Luo Z, Xu Q. The mechanism of stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 2010 Juni 10,104(3)
60. Hibino N, Shin'oka T, Matsumura G, Ikada Y, Kurosawa H. The tissue-engineered vascular graft using bone marrow without culture. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129 :1064-1070

61. Simper D, Stalboerger P.G, Panetta C.J, Wang S, Caplice N.M. Smooth Muscle Progenitor Cells in Human Blood. *Circulation* 2002; 106(2): 1199-1204.
62. Mead L.E, Prater D, Yoder M.C, Ingram D.A. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from human blood. Department of Pediatrics 2008, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA.
63. Khambadkone S, Bonhoeffer P.: Percutaneous pulmonary valve implantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg. Annu.* 2006; 23-28
64. Steinhoff G.: [The regenerating heart -- hope for children with congenital heart defects]. *Kinderkrankenschwester.* 2006; 25: 47-50

7. Danksagungen

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Georg Lutter, Leiter de Lehrstuhls für Experimentelle Herzchirurgie und Herzklappenersatz des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, für die Möglichkeit, in seiner Abteilung promovieren zu dürfen.

Für die Bereitstellung des Themas und die stets freundliche und hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. med. Georg Lutter bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Anja Metzner, die mir mit ihrer kompetenten Betreuung immer erreichbar zur Seite stand. Ihre Unterstützung und die guten Gespräche habe ich sehr geschätzt.

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Abteilung der Experimentellen Herzchirurgie für die freundliche, geduldige und tatkräftige Unterstützung bedanken, besonders bei Marion Krüger und Christine Hass. Für das intensive Engagement bei der technisch anspruchsvollen und äußerst aufwendigen Weiterentwicklung des Bioreaktors möchte ich vor allem Herrn Mück danken.

Herrn Sebastian Ritter und Phillpp Hauenstein danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Tierversuchen.

Ganz besonderen Dank gilt meiner Familie und vor allem meinen Eltern, die mir das Studium und diese Dissertation überhaupt ermöglichten. Dafür dass sie sind wie sie sind und ihre engagierte Anteilnahme.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Pirogow, Andreas
Anschrift	Maulhoop 63, 27283 Verden (04231 6675528)
geboren	am 01.03.1979 in Alma-Ata, Kasachstan
Familienstand	verheiratet, Tochter Julia, geb. 04.02.2009 und Tochter Emilia, geb. 01.02.2012
Staatsangehörigkeit	Deutsch seit 1996

Schulbildung und Studium

1986 – 1996	Die Schule Nr. 5 in Naro-Fominsk (Moskauer Gebiet) erfolgreich abgeschlossen
1996 – 1997	Berufsvorbereitungsjahr in der Berufsschule Verden/Aller erfolgreich abgeschlossen
1997 – 1998	Intensiver Deutsch-Sprachkurs bei Otto- Benecke-Stiftung in Hannover erfolgreich abgeschlossen
1998 – 2001	Sonderlehrgang für Spätaussiedler zum Erlangen der Hochschulreife in Göttingen erfolgreich abgeschlossen
02.01. – 30.09.2002	Wehrdienst
15.10.2002 - 16.12.2009	Hochschulstudium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel erfolgreich abgeschlossen
aktuell seit 09/2006	Promotion am Lehrstuhl für Experimentelle Herzchirurgie und Herzklappenersatz, CAU Kiel Thema: „ <i>IN VITRO ENTWICKLUNG UND HISTOLOGISCHE EVALUATION EINER TISSUE-ENGINEERTEN STENTKLAPPE ZUM PERKUTANEN PULMONALKLAPPENERSATZ AM OVINEN MODELL</i> “.

Arbeit

09/2006 – 12/2009	OP-Hilfskraft in der Endoprothetik, Lubinus Klinikum Kiel
-------------------	--

01/2010- 12/2012

Chirurgischer Ass.-Arzt in der Aller-
Weser- Klinik Verden

seit 01/2013

Ass.-Arzt in der Allgemein-, Visceral- und
Onkologischen Chirurgie im Klinikum
Bremen-Mitte

