

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

**Perkutaner Pulmonalklappenersatz und Tissue Engineering:  
Histologische Evaluation verschiedener Zelltypen und deren  
Strukturveränderungen beim perkutanen tissue-engineerten  
Pulmonalklappenersatz**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Hanns Leonhard Kaatsch

aus Kiel

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Lutter, Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hendrik Bonnemeier, Klinik für Innere Medizin III  
mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.10.2018

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Abkürzungsverzeichnis .....	5
1. Einleitung .....	7
1.1. Das Herz.....	7
1.2. Anatomie und Histologie der Herzklappen .....	8
1.2.1. Anatomie .....	8
1.2.2. Histologie und Aufbau einer Herzklappe .....	9
1.3. Angeborene Herzfehler des rechtsventrikulären Ausflusstraktes mit Beteiligung der Pulmonalklappe.....	10
1.4. Pathophysiologie und Klinik der angeborenen Herzfehler des RVOT mit Beteiligung der Pulmonalklappe .....	12
1.5. Chirurgische Rekonstruktion des rechtsventrikulären Ausflusstraktes .....	12
1.6. Materialien für den Pulmonalklappenersatz .....	14
1.7. Minimalinvasive Implantation des Pulmonalklappenersatzes.....	15
1.8. Tissue Engineering.....	17
1.9. Fragestellung und Zielsetzung.....	19
2. Methoden und Materialien .....	20
<b>2.1. Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1.1. Herstellung der tissue-engineerten Klappe .....	20
2.1.2. Minimal invasive perkutane Implantation .....	25
<b>2.2. Histochemische und immunhistochemische Färbemethoden .....</b>	<b>27</b>
2.2.1. Paraffin-Einbettung und Anfertigung der Schnitte .....	27
2.2.2. Bindegewebsfärbungen .....	28
2.2.3. Immunhistochemische Färbung.....	29
2.2.4. Begutachtung der Schnitte.....	30
2.2.5. Makroskopische Beurteilung der explantierten Klappen .....	31
<b>2.3. Materialien .....</b>	<b>32</b>
3. Ergebnisse .....	37
<b>3.1. Ergebnisse: Besiedelte und nicht implantierte Klappen (BN).....</b>	<b>37</b>
3.1.1. Mikroskopische Auswertung.....	37

3.1.2. Zusammenfassung der Ergebnisse von BN 1-5 .....	48
<b>3.2. Ergebnisse: Besiedelte, implantierte, nach 4 Wochen explantierte Klappen (BI)</b>	<b>49</b>
3.2.1. Klinik und makroskopische Auswertung .....	49
3.2.2. Mikroskopische Auswertung.....	53
3.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse von BI 1-5.....	67
4. Diskussion .....	70
4.1. Dezellularisierung.....	70
4.2. Besiedlung des Grundgerüsts mit autologen Endothelzellen und Myofibroblasten....	72
4.3. Überblick: Autologe Zellen zur Besiedlung der Herzklappen.....	76
4.4. Verkalkungen der Bioprothesen .....	78
4.5. Ausblick.....	80
5. Zusammenfassung.....	82
6. Literaturverzeichnis.....	83
7. Danksagung.....	89

**Abkürzungsverzeichnis**

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
CD	„Cluster of Differentiation“
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CT	Computertomographie
DNA	„Deoxyribonucleic acid“
engl.	Englisch
FAB	„Fragment antigen binding“
FC	„Crystallisable fragment“
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
IE	Internationale Einheiten
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
mg	Milligramm
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaCl	Natrium-Chlorid
nl	Nanoliter
PBS	„Phosphate buffered saline“
RVOT	„Right ventriculare outflow tract“

s.	siehe
S.	Seite
Tab.	Tabelle
V.	Vena
VIC	„Valve interstitial cells“
VSD	Ventrikelseptumdefekt
z.B.	zum Beispiel

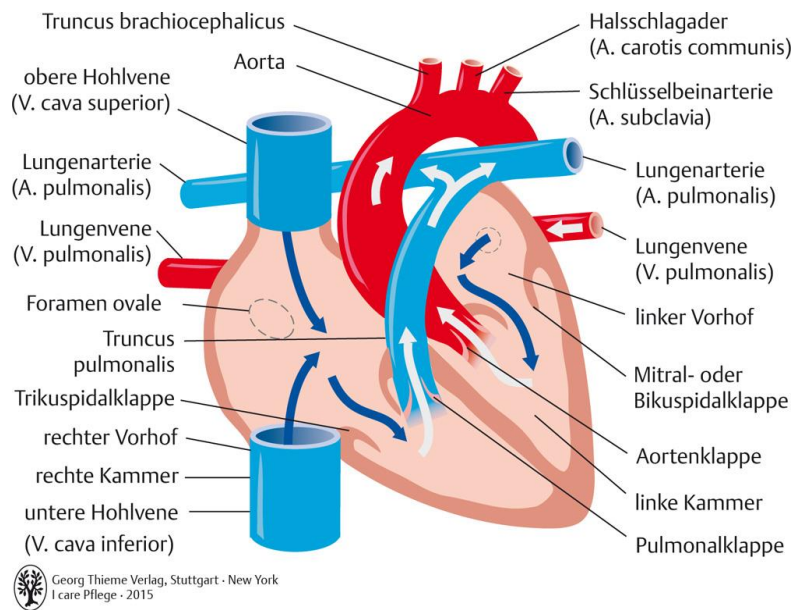
# 1. Einleitung

## 1.1. Das Herz

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan, das mit rhythmischen Kontraktionen den Körper mit nährstoffreichem und sauerstoffreichem Blut versorgt. Die höherentwickelten Herzen der Wirbeltiere saugen das Blut ventilgesteuert aus den Blutgefäßen an und stoßen es durch andere Blutgefäße wieder ab. Hierbei lassen sich im Herzen vier Binnenräume unterteilen, jeweils zwei Vorhöfe und zwei Kammern. Die Vorhöfe sind durch die Vorhof-Kammerklappen (Trikuspidal- und Mitralklappe) von den Kammern und die Kammern durch die Gefäßklappen (Aorten- und Pulmonalklappe) von den sich anschließenden Arterien separiert. Es existieren zwei Kreislaufsysteme, ausgehend vom rechten und linken Herz, welche sich durch unterschiedliche Blutdrücke auszeichnen und anatomisch voneinander getrennt sind [1] (Abb. 1).

Desoxygeniertes Blut, welches aus dem Körperkreislauf zum Herzen befördert wird, fließt aus der oberen und unteren Hohlvene in den rechten Vorhof. Von dort gelangt es durch die Öffnung der Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel, der das Blut über die Pulmonalklappe in die Lunge pumpt. Anschließend erfolgt die Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff. Im rechten Herzen herrscht ein mittlerer Blutdruck von ca. 13 mmHg, weshalb der Lungenkreislauf auch als Teil des Niederdrucksystems im Körperkreislauf angesehen wird (Abb. 1, blau).

Das Blut, welches in der Lunge mit Sauerstoff angereichert wurde, strömt durch die Pulmonalvenen in den linken Vorhof. Um in den Körperkreislauf zu gelangen, fließt es nach Öffnung der Mitralklappe in die linke Herzkammer. Durch die Kammerkontraktion und Öffnung der Aortenklappe wird das Blut in die Aorta und somit in den Körperkreislauf ausgetrieben. Dieser Teil des Herzens ist dem Hochdrucksystem zugeordnet, da in der linken Herzkammer und den zentralen Arterien des Körperkreislaufes ein mittlerer Blutdruck von 50-80 mmHg herrscht [2] (Abb. 1, rot).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Blutflusses durch das Herz [3]. Desoxygeniertes Blut (blau) fließt aus dem Körperkreislauf in den rechten Vorhof und wird durch eine Vorhofkontraktion über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel gepumpt. Während der Systole strömt das Blut durch die Pulmonalklappe in die Pulmonalarterien und wird anschließend in der Lunge mit Sauerstoff angereichert. Oxygeniertes Blut (rot) fließt aus dem Lungenkreislauf durch die Pulmonalvenen in den linken Vorhof und wird während der Austreibungsphase des Herzens durch die Aortenklappe in den Körperkreislauf gepumpt.

## 1.2. Anatomie und Histologie der Herzklappen

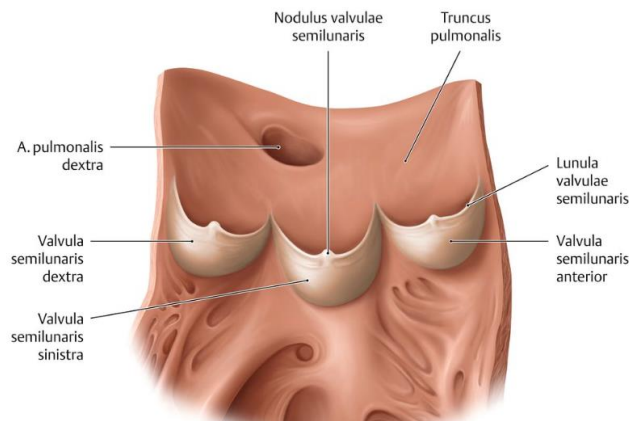
### 1.2.1. Anatomie

Die Anordnung der Herzklappen erfolgt in der sogenannten Klappen- oder Ventilebene. In dieser Ebene sind sie von einer Bindegewebsschicht, dem sogenannten Herzskelett, umgeben und in diesem eingebettet. Das Herzskelett trennt die Muskulatur der Vorhöfe und Kammern voneinander und dient als mechanischer Fixpunkt der Herzklappen sowie der elektrischen Isolation. Die Konfiguration der Herzklappen bestimmt die Flussrichtung des Blutes und somit erfüllen sie eine Ventilfunktion, indem Blut nur in eine Richtung durch die Klappen strömen kann. Im Folgenden wird eine ausführliche Darstellung der Taschenklappen vorgenommen, da sich das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf die Pulmonalklappe richtet.

Die Gefäßklappen bestehen aus drei halbmondförmigen Segeln, die am Beginn des Truncus pulmonalis und der Aorta liegen. Sie inserieren dort mit ihrer Basis am Faserring, dem sogenannten Anulus. Als Kommissur bezeichnet man den wandständige Segelbereich, in welchem sich benachbarte Segel berühren. Die freien Ränder des jeweiligen Segels heißen La-



nulae valvulae semilunares, die bogenförmig zu einem Knötchen (Nodus valvulae semilunaris) zusammenlaufen. Durch Adaption der benachbarten Lanulae und Noduli wird ein dichter Verschluss der Ränder hergestellt (Abb. 2).

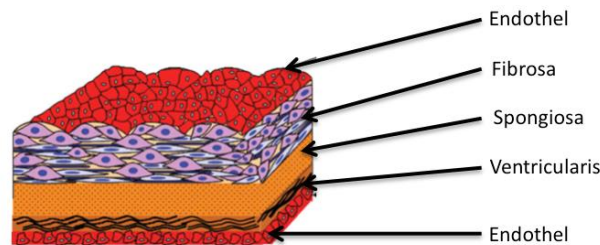


**Abbildung 2:** Anatomie und Aufbau der Pulmonalklappe und des rechtsventrikulären Ausflusstraktes [1]. Die Pulmonalklappe setzt sich aus drei halbmondförmigen Klappentaschen (Valvulae semilunares) zusammen und befindet sich am Übergang vom rechten Ventrikel zum Truncus pulmonalis.

### 1.2.2. Histologie und Aufbau einer Herzklappe

Der Aufbau einer Gefäßklappe im Allgemeinen gliedert sich in vier Schichten. Die äußerste Schicht bilden Endothelzellen, die auf der ventrikulären Seite eine glatte und auf der dem Gefäß zugewandten Seite eine gefurchte Oberfläche aufweisen [4]. Zwischen der ventrikulären und der arteriellen Oberfläche befinden sich drei weitere Schichten: Die Ventrikularis, die Spongiosa und die Fibrosa (Abb. 3). Unterhalb der dem Ventrikel zugewandten Endothelschicht befindet sich die Ventrikularis, welche hauptsächlich aus dichten elastischen Fasern und Kollagen besteht. Diese Schicht stellt sicher, dass die Klappe nach der Öffnung wieder in ihre ursprüngliche Form zurückkehrt [5]. In der Mitte befindet sich die Spongiosa, welche reich an Glykosaminoglykanen und lockerem kollagenem Bindegewebe ist und das Grundgerüst der Klappe bildet. Sie dient vor allem der Verformbarkeit und Elastizität der Herzklappe. Zur Gefäßseite hin wird die Spongiosa von der Fibrosa bedeckt. Hier findet man vor allem dichtes kollagenes Bindegewebe [6]. Die Hauptaufgabe der Fibrosa ist es, den in der Diastole aufgebauten Druck aufrechtzuerhalten. Innerhalb der verschiedenen Schichten finden sich interstitielle Zellen (auch *Valve interstitial cells* (VIC) genannt), die Eigenschaften von glatten Muskelzellen und Fibroblasten vereinigen [7] und als Myofibroblasten bezeichnet werden.

Sie produzieren extrazelluläre Matrixbestandteile und tragen damit entscheidend zur Stabilität des Gewebeverbandes bei.



**Abbildung 3:** Darstellung des histologischen Klappenaufbaus nach [8]. In rot ist die Endothelzellschicht, in lila die Fibrosa, in orange die Spongiosa und in schwarz die Ventricularis dargestellt. Unten ist die glatte Oberfläche der ventrikulären Seite der Herzklappe zu erkennen, an der Oberseite stellt sich die gefurchte Oberfläche der arteriellen Seite der Gefäßklappen dar.

### 1.3. Angeborene Herzfehler des rechtsventrikulären Ausflusstraktes mit Beteiligung der Pulmonalklappe

Der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt des Herzens (*Right ventricular outflow tract (RVOT)*) umfasst subvalvuläre und ventrikuläre Strukturen, die Pulmonalklappe und die Pulmonalarterie, welche das Blut vom rechten Ventrikel in die Lungenstrombahn transportiert. Im Rahmen einer Anomalie des RVOT kann eine Stenose der Pulmonalklappe vorliegen, bei der es durch eine Verengung der Klappenöffnungsfläche zu einem verminderten Fluss über die Klappe kommt. Andererseits kann eine Pulmonalklappeninsuffizienz auftreten, bei der es durch unzureichenden Klappenschluss zu einem vermehrten Rückfluss des Blutes kommt. Es kann auch eine Kombination beider Entitäten (kombiniertes Vitium) bestehen.

Etwa 95 % der kongenitalen Vitien sind angeboren, ca. 5 % gehören der Gruppe der erworbenen Herzklappenerkrankungen im Säuglings- und Kindesalter an und sind vorrangig entzündlicher Genese [9]. Pathologien des rechtsventrikulären Ausflusstraktes sind fast ausschließlich auf angeborene Herzfehler zurückzuführen, da erworbene Vitien am seltensten die Pulmonalklappe betreffen [10]. Im Folgenden ist eine Auflistung der häufigsten angeborenen Herzfehler mit Beteiligung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes aufgeführt.

**Tabelle 1:** Übersicht der Herzfehler mit Beteiligung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes nach [9, 11]

Herzfehler	Inzidenz kongenitaler Herzfehler	Definition
Fallot-Tetralogie (TOF)	10 – 15 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infundibuläre oder valvuläre Pulmonalstenose</li> <li>• Ventrikelseptumdefekt (VSD)</li> <li>• Überreiten der Aorta über dem VSD</li> <li>• Rechtsventrikuläre Hypertrophie</li> </ul>
Double Outlet Right Ventricle (DORV)	0,5 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gemeinsamer Ursprung der Aorta und der A. pulmonalis aus rechtem Ventrikel in Kombination mit einem Ventrikelseptumdefekt</li> <li>• Kann mit einer Pulmonalstenose einhergehen</li> </ul>
Kongenitale Pulmonalstenose (PS)	10 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obstruktion des RVOT</li> <li>• Valvuläre Stenose (90 % aller Stenosen)</li> <li>• Subvalvuläre Stenose (Infundibulärer und subinfundibulärer Typ)</li> <li>• Supravalvuläre Stenose (meist in Kombination mit anderen Anomalien)</li> </ul>
Transposition der großen Arterien (TGA)	6 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ursprung der Aorta aus dem rechten Ventrikel und der Pulmonalarterie aus dem linken Ventrikel</li> <li>• 20 % der Patienten weisen einen zusätzlichen Ventrikelseptumdefekt auf</li> </ul>
Truncus arteriosus communis (TAC)	1-0,5 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ursprung einer Arterie aus beiden Ventrikeln</li> <li>• Unterhalb der Arterie besteht ein Ventrikelseptumdefekt</li> </ul>
Pulmonalatresie mit Ventrikelseptumdefekt (PA-IVS)	0,3 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Angeborener Verschluss der Pulmonalklappe mit bestehendem Ventrikelseptumdefekt</li> </ul>

#### **1.4. Pathophysiologie und Klinik der angeborenen Herzfehler des RVOT mit Beteiligung der Pulmonalklappe**

Alle Fehlbildungen des RVOT umfassen Stenosierungen des Ausflusstraktes oder eine Pulmonalklappeninsuffizienz. Als Folge einer Stenosierung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes kommt es zur fortwährenden Druckerhöhung des rechten Ventrikels mit resultierender Rechtsherzhypertrophie und Trikuspidalinsuffizienz. Durch fortschreitenden fibrotischen Umbau aufgrund vermehrter Schädigung des Myokards resultiert eine diastolische Dysfunktion mit Einschränkungen der Belastbarkeit und gehäufterem Auftreten von Herzrhythmusstörungen [12]. Die vermehrte Volumenbelastung im Rahmen einer Insuffizienz führt sowohl zu einer diastolischen als auch einer systolischen Dysfunktion des rechten Ventrikels. Die Patienten klagen über eine geringere Belastbarkeit und eine Reduzierung der Lebensqualität [13]. Das vermehrte Volumen führt zur Dilatation des Ventrikels und begünstigt die Entstehung von malignen Herzrhythmusstörungen [14]. Sekundär kann die Funktion des linken Ventrikels durch Dysfunktion des rechten Ventrikels beeinträchtigt werden. Als Ursache sind hier irreguläre Septumbewegungen und -hypertrophie sowie eine Störung der elektrischen Synchronität anzuführen [15]. Ohne Behandlung führen diese Vitien zu einer eingeschränkten Lebenserwartung.

#### **1.5. Chirurgische Rekonstruktion des rechtsventrikulären Ausflusstraktes**

Ziel der Rekonstruktion des RVOT ist die Beseitigung einer Obstruktion und einer möglichen Insuffizienz, um die Prognose und Lebensqualität der Patienten zu verbessern. Indiziert ist ein solches Verfahren bei Patienten mit einem neu diagnostizierten angeborenen Herzfehler des rechten Ausflusstraktes oder bei denjenigen, die im Verlauf nach primärer Korrekturoperation eine Re-Operation aufgrund einer RVOT-Obstruktion oder Klappeninsuffizienz benötigen.

In der Therapie steht die Beseitigung der Pulmonalklappeninsuffizienz im Vordergrund, da diese einen signifikanten Einfluss auf die Prognose des Patienten hat [16]. Man nimmt sogar eine geringfügige residuelle Obstruktion in Kauf, da hierdurch eine sekundäre Klappeninsuffizienz verhindert und der rechte Ventrikel somit geschützt wird [17]. Es existieren zwei unterschiedliche Strategien bei der chirurgischen Behandlung, die Anulus-erhaltende operative Intervention und die frühzeitige radikale Korrekturoperation.

Die Anulus-erhaltende operative Intervention bewahrt die Integrität der Klappe und wird vorrangig bei Obstruktionen des RVOTs, wie zum Beispiel der Fallot'schen Tetralogie angewandt. Im Vergleich bewirkt eine Erweiterung des Anulus mittels transanulären Perikard-Patches zwar eine komplette Beseitigung der Obstruktion, jedoch führt ein solches Vorgehen in den meisten Fällen zu einer sekundären Klappeninsuffizienz und zu damit verbundenen negativen Auswirkungen [18].

Mit Verbesserung der chirurgischen Techniken und des perioperativen Managements ist eine immer frühere radikale Korrekturoperation möglich. Eine Volumen- und Druckbelastung des rechten Ventrikels verursacht einen Umbau des Myokards und der negative Einfluss einer Zyanose und einer verminderten Auswurfleistung des Ventrikels auf die Organentwicklung führen dazu, dass heutzutage vermehrt eine frühe primäre/radikale Korrekturoperation in Betracht gezogen wird. Jedoch zeigen die Ergebnisse frühzeitiger radikaler Korrekturoperationen bei der Fallot'schen Tetralogie, dass trotz geringer perioperativer Mortalität die Wahrscheinlichkeit von Re-Operationen steigt [19]. Als Ursache wird der vermehrte Einsatz von transanulären Patches und einem daraus resultierenden häufigeren Auftreten von Pulmonalklappeninsuffizienzen angesehen [20].

Aufgrund des wissenschaftlichen und technischen Fortschrittes sowie der Anpassung der therapeutischen Strategien in der Behandlung von angeborenen Herzfehlern nimmt die Zahl der Patienten, die das Erwachsenenalter erreichen, stetig zu [21] und somit auch die Anzahl an Re-Operationen nach initialer Korrektur einer Anomalie. Es konnte im Rahmen von Studien gezeigt werden, dass 4 % aller operativ sanierten Pulmonalstenosen [22] und 10 - 20 % der primären Fallot-Korrekturen [23, 24] eine wiederholte chirurgische Intervention nach sich zogen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl die optimale Lösung bezüglich des richtigen Zeitpunktes einer radikalen Korrekturoperation und der RVOT-Rekonstruktion sowie das Erfordernis von Re-Operationen Kernprobleme in der Behandlung von angeborenen Herzfehlern des rechtsventrikulären Ausflusstraktes darstellen.

## 1.6. Materialien für den Pulmonalklappenersatz

Für den Ersatz der Pulmonalklappe im Rahmen der Rekonstruktion des RVOT stehen unterschiedliche Transplantate (Grafts) zur Verfügung. Pädiatrische Patienten erhalten in der Regel Homografts oder bovine, also xenogene Jugularvenengrafts, da die anatomischen Gegebenheiten zu einer Größenbeschränkung der möglichen einsetzbaren Optionen führen. Hingegen wird bei älteren und erwachsenen Patienten der Klappenersatz mit einer xenogenen, meist porcinen oder bovinen, oder einer mechanischen Klappe bevorzugt.

Im Folgenden werden die verschiedenen Optionen für den chirurgischen Ersatz der Pulmonalklappe im Rahmen der Rekonstruktion des RVOT erläutert und auf die Vor- und Nachteile der jeweiligen Verfahren sowie Limitationen eingegangen.

Homografts, also humane Herzklappen von Spendern, werden häufig als erste Wahl für den Ersatz der Pulmonalklappe verwendet. Vorteil der menschlichen Klappen ist eine ausgezeichnete Klappenfunktion und keine Notwendigkeit einer Antikoagulation. Die Verfügbarkeit ist jedoch von Spendern abhängig und damit begrenzt. Außerdem wurden bei der histologischen Untersuchung explantierter Homografts Immunreaktionen und Abstoßungsprozesse gegen die implantierten Herzklappen sowie degenerative Veränderungen, unter anderem Kalzifizierungen der Segel, nachgewiesen [25, 26].

Eine weitere Option ist die Verwendung von xenogenen Transplantaten. Hierbei unterscheidet man zwischen dem Einsatz von bovinen Jugularvenengrafts und porcinen Herzklappengrafts.

Die Implantation einer klappentragenden Rindervene ist der sogenannte Contegra<sup>®</sup>-Graft. Es wurden bei diesem Verfahren ebenfalls Stenosierungen und entzündliche Prozesse im Rahmen von immunologischen Abstoßungsreaktionen beobachtet [27]. Zudem wächst dieses Implantat nicht mit dem jungen Patienten mit und es ist eine antikoagulatorische Therapie aufgrund von beobachteten Thrombusbildungen im Conduit erforderlich [28].

Der Einsatz von xenogenen Herzklappen zeichnet sich durch eine gute Verfügbarkeit des Klappenmaterials, vergleichsweise geringe Kosten und keiner Notwendigkeit einer Antikoagulation aus. Obwohl der xenogene Herzklappenersatz zufriedenstellende Zwischenergebnisse im Rahmen von Studien lieferte [29], konnte jedoch gezeigt werden, dass im Langzeitverlauf Kalzifizierungen des Klappenapparates auftraten, die im Zusammenhang mit immunologischen Abstoßungsreaktionen stehen und zu einem Versagen des Implantates führen

[30]. Aufgrund der begrenzten Haltbarkeit werden biologische Klappen vorrangig bei Patienten implantiert, die eine Antikoagulation umgehen möchten, wie zum Beispiel Frauen mit Kinderwunsch.

Mechanische Herzklappen weisen gute Langzeitergebnisse auf [31] und verhindern somit häufige Re-Operationen bei bereits mehrfach operierten Patienten. Die Verwendung dieser Klappenprothese bringt allerdings den Nachteil einer notwendigen Antikoagulation mit sich. Aus diesem Grund zieht man den mechanischen Herzklappenersatz dann in Betracht, wenn eine antikoagulatorische Therapie schon besteht oder aufgrund anderer Ursachen indiziert ist.

Im Rahmen der chirurgischen Rekonstruktion des RVOT verbleiben häufig residuelle Läsionen oder es entstehen im Verlauf Stenosen und Insuffizienzen der Conduit-Implantate oder biologischen Klappen, die zu einer Dysfunktion des rechten Ventrikels führen. Als weitere therapeutische Alternative zur offen-chirurgischen Behandlung dieser Komplikationen ist in den letzten Jahren die Katheter-basierte Implantation des Pulmonalklappenersatzes vermehrt in den Vordergrund gerückt.

### **1.7. Minimalinvasive Implantation des Pulmonalklappenersatzes**

Angeborene Herzfehler des rechten Herzens führen im Vergleich aller kongenitalen Herzfehlern am häufigsten zu Re-Operationen [32]. Der minimalinvasive Herzklappenersatz mittels Katheter reduziert die mit einer offenen Herzoperation verbundenen Risiken und die häufige Notwendigkeit einer Re-Operation. Bei diesem Verfahren wird ein in die Leistenvene eingebrachter Herzkatheter verwendet, über den ein Herzklappenersatz zum Herzen vorgeschoben wird und an Position der erkrankten Klappe platziert wird. Einerseits führt ein minimal-invasives Vorgehen zu einer kürzeren Hospitalisierung und schnelleren Rehabilitation des Patienten [33], andererseits können Patienten mit bestehender Kontraindikation für eine offene Operation therapiert werden. Vor allem ältere Patienten mit bereits repariertem oder primär palliativ behandeltem angeborenem Herzfehler des rechten Herzens können von diesem Verfahren profitieren.

Erstmals beschrieben wurde die erfolgreiche minimal-invasive Implantation einer Herzklappe in Position der Pulmonalklappe im Menschen im Jahr 2000 von Bonhoeffer et al. [34]. Es war gleichzeitig der erste erfolgreiche perkutane Herzklappenersatz im Menschen über-

haupt. Aufgrund einer kombinierten Stenose und Insuffizienz eines Conduits wurde die Venenklappe eines Rinds, welche in einen Ballon-expandierbaren Stent eingenäht wurde, bei einem zwölfjährigen Patienten implantiert. Es konnte hierdurch die Stenosierung des Conduits teilweise entlastet und der Rückstrom im Rahmen der Insuffizienz beseitigt werden. Seitdem wurde diese Klappe, Melody®-Pulmonalklappe (Medtronic, Minneapolis, Minnesota), mit graduellen Modifizierungen in über 450 Patienten implantiert und verschiedene Studien konnten ihre klinische Wirksamkeit belegen [35, 36]. Der Einsatz dieser Klappe ist jedoch von den Dimensionen und der Anatomie des RVOT abhängig. Erfolgte bereits eine Erweiterung des RVOT mittels Perikard-Patch, weist der Pulmonalarterienhauptstamm häufig einen Durchmesser von über 24 mm auf und ist somit für eine Implantation der Melody®-Klappe mit einem maximal verfügbaren äußeren Klappendurchmesser von 24 mm nicht geeignet [37]. Dahingegen ist die SAPIEN™-Klappe (Edwards Life Sciences, Irvine, California) bis zu einem Klappendurchmesser von 29 mm erhältlich und wird in letzter Zeit vermehrt für den perkutanen Pulmonalklappenersatz bei Durchmessern des RVOT von bis zu 28 mm implantiert. Die Klappe wird aus bovinem Perikardgewebe hergestellt und mittels eines Ballons in Zielposition expandiert. Erste Ergebnisse zeigen, dass die SAPIEN™-Klappe eine brauchbare Option für den minimalinvasiven Ersatz der Pulmonalklappe darstellt und somit eine Behandlung von Patienten mit größeren Homografts, xenogenen Klappen oder nativen rechtsventrikulären Ausflustrakten ermöglicht [38]. Nichtsdestotrotz ist der Einsatz des perkutanen Herzklappenersatzes aufgrund des maximalen Durchmessers der verfügbaren Klappen limitiert. Weiterhin sind die xenogenen Klappen der obengenannten Produkte anfällig für degenerative Veränderungen und Kalzifizierungen der Klappensegel [39], was zu einer begrenzten Lebensdauer führt. In der momentanen klinischen Praxis wird der perkutane Herzklappenersatz lediglich als palliative Maßnahme angewendet, um eine Re-Operation hinauszuzögern.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass alle klinisch verwendeten Materialien verschiedene Vor- und Nachteile mit sich bringen und ein Großteil der Patienten im Verlauf ihres Lebens mehrere Re-Operationen und Komplikationen zu erwarten hat. Im Jahr 1976 postulierten W.C. Roberts und Kollegen [40] Anforderungen an einen Herzklappenersatz: Ein optimaler Herzklappenersatz sollte sich durch gute hämodynamische Eigenschaften, Langlebigkeit und eine simple Handhabung während der Implantation auszeichnen. Des Weiteren sollten keine Thrombogenität und keine traumatischen Veränderungen des Blutes von der Klappe ausge-



hen. Seitdem ist man diesem Ideal in bestimmten Bereichen näher gekommen, jedoch erfüllt keine verfügbare Ersatzklappe alle aufgezählten Eigenschaften. Ein vielversprechender Ansatz zur Lösung des Problems stellt die Entwicklung von tissue-engineerten Herzklappen dar.

## 1.8. Tissue Engineering

Tissue Engineering bezeichnet die künstliche Herstellung biologischer Gewebe durch *in vitro/ex vivo*-Kultivierung autologer Zellen und die anschließende (Re-)Implantation in den Patienten. Es vereint unterschiedliche Methoden aus den Ingenieurs-, Werkstoff- und Naturwissenschaften, um eine Ersatzklappe mit autologen Zellen zu erzeugen, welche die Fähigkeit zur Reparatur, Adaptation an neue Gegebenheiten und zum „Mitwachsen“ hat. Diese Eigenschaften würden dazu beitragen, dass unter Anderem häufige Re-Operationen bei Patienten mit angeborenen Herzfehlern in Zukunft vermieden werden könnten.

Im Bereich der herzchirurgischen Forschung werden juvenile Schafe als Versuchstiere gewählt, da das Schaf ein geeignetes Großtiermodell zur Erforschung der Biokompatibilität von sowohl allogenen als auch xenogenen Materialien darstellt [41, 42]. Das Herz eines Schafes weist ähnliche hämodynamische Eigenschaften und eine vergleichbare Größe zum humanen Herzen auf und liefert durch eine Vielzahl an veröffentlichten Studien bei der Erforschung neuer Herzklappen eine gute Vergleichsgrundlage. Als Grundgerüst der tissue-engineerten Herzklappe werden biologisch abbaubare Materialien verwendet, die eine Matrix mit dreidimensionaler Grundstruktur liefern, an der Zellen angesiedelt werden können und die eine mechanische Stabilität für den Zellverbund gewährleisten [43-45]. Hierfür werden unter anderem xenogene porcine Herzklappen verwendet, welche vorher einem Dezellularisierungsverfahren unterzogen wurden, um die porcine Zellpopulation zu entfernen und spätere Immunabstoßungsreaktionen zu unterbinden. Problematisch bei der Etablierung eines geeigneten Verfahrens gestaltet sich auf der einen Seite die suffiziente Entfernung aller xenogener Zellen andererseits die Konservierung der Matrix.

Die Verwendung von verschiedenen Zellsorten zur Besiedlung einer Herzklappenmatrix ist Gegenstand der aktuellen Forschung [46-50]. Als Zellsorte eignen sich unter anderem Myofibroblasten und Endothelzellen, da diese Bestandteil der nativen Zellpopulation humaner Herzklappen sind. Durch das Einwachsen glatter Muskelzellen soll dem Grundgerüst zunehmende Stabilität und Struktur verliehen und das Grundgerüst sukzessiv degradiert werden.

Die Reendothelialisierung mit autologen Endothelzellen bewirkt ein geringeres Auftreten von Thromben sowie eine geringere Neointimabildung und führt somit zu besseren Langzeitergebnissen in der Erforschung tissue-engineerter Herzklappen [51]. Die Zellen werden vor Implantation physiologischen Bedingungen ausgesetzt, um sich bereits an spätere Anforderungen im Schaf anzupassen. Mit Hilfe von biotechnologischen Verfahren wird hierfür ein Bioreaktor bereitgestellt, mit dem verschiedene pH-Werte und die Temperatur eingestellt werden können sowie die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung gewährleistet wird. Diese Apparatur ermöglicht eine *in vitro*-Herstellung von Herzklappen sowie die Beeinflussung der 3D-Geometrie der Klappe [52]. Weiterhin können die besiedelten Herzklappen simulierten physikalischen Belastungen, wie zum Beispiel Scherspannungen und mechanischen Spannungen, ausgesetzt werden [53, 54].

Ein entscheidender Vorteil, den man sich von tissue-engineerten Herzklappen erhofft, wäre die erhöhte Biokompatibilität im Vergleich zu den momentan in der klinischen Verwendung befindlichen biologischen Klappenprothesen. Jedoch treten sowohl bei biologischen Herzklappen, wie unter 1.6. dargestellt, als auch bei tissue-engineerten Herzklappen, wie von Alain Olivier in einer eigenen Arbeit ausgeführt [55], degenerative Veränderungen auf, die mutmaßlich auf immunologische Abstoßungsreaktionen und damit einhergehende Kalzifizierungen zurückzuführen sind. Um eine verlängerte Haltbarkeit der Klappenprothesen zu erreichen, ist das Verständnis des Zusammenhanges von immunologischen Reaktionen und Kalzifizierungen sowie ihrer Ursachen essentiell.

Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Georg Lutter erforscht die Vereinbarkeit des perkutanen Herzklappenersatzes mit der Herstellung und dem Einsatz von tissue-engineerten Herzklappen. In einem Projekt der Arbeitsgruppe wurden dezellularisierte porcine Herzklappen verwendet, welche eine geeignete Grundlage für die Besiedlung mit autologen Zellen liefern und im Vergleich zu humanen Homografts in großer Anzahl verfügbar sind. Als Quelle autologer Zellen wurden Endothelzellen und Myofibroblasten aus der Halsschlagader des jeweiligen Versuchstieres gewonnen und mittels Zellkulturen und molekularbiologischer Methoden gezüchtet. Nach statischer Besiedlung und dynamischer Kultivierung wurden die Herzklappen anschließend in selbst-expandierbare Stents aus Nitinol eingenäht. Aufgrund der kontinuierlich ausgeübten Zentripetalkraft und der großen Flexibilität des Stents kann sich dieser optimal an die anatomischen Gegebenheiten anpassen.

*In vivo*- und *post mortem*-Analysen der Klappenstents sollen nunmehr Aufschluss über die Funktionalität der Herzklappe und strukturelle Veränderungen geben, welche die Klappenfunktion beeinflussen. Hierdurch könnte die bestehende Problematik bei der Behandlung von angeborenen Herzfehlern des rechtsventrikulären Ausflusstraktes gelöst und eine zukunftsweisende therapeutische Strategie entwickelt werden.

### **1.9. Fragestellung und Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist es, die zuvor von unserer Arbeitsgruppe entwickelten und hergestellten tissue-engineerten Herzklappen im Schafmodell zu implantieren und durch histologische und immunhistochemische Verfahren eine Auswertung bezüglich des Dezellularisierungsprozesses, der Re-Besiedlung von dezellularisierten Matrices sowie des Auftretens von Verkalkungen der porcinen Herzklappen im *in vivo*-Versuch durchzuführen. Speziell die Besiedlung der Matrix mit autologen Zellen und die Produktion des extrazellulären Gewebeverbandes wird analysiert, um Aufschluss über die Effektivität der verwendeten Verfahren zu erlangen.

Folgende Fragen sind im Einzelnen zu klären:

- Sind das verwendete Dezellularisierungsverfahren und der Herstellungsprozess der Herzklappen wirksam und geeignet, um eine azelluläre Matrix herzustellen?
- Wie entwickeln sich die ovinen Endothelzellen und Myofibroblasten nach *in vitro*-Besiedlung im Bioreaktor und welche Veränderungen bezüglich Zellviabilität und Zellverteilung sind nach einer *in vivo*-Verweildauer von 4 Wochen im Vergleich zu nicht implantierten Klappen zu beobachten?
- Sind Verkalkungen in den tissue-engineerten Herzklappen nachzuweisen und in welchen Bereichen treten diese gehäuft auf?

## **2. Methoden und Materialien**

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien, das Verfahren zur Herstellung einer tissue-engineerten Herzklappe, das Applikationsverfahren und die histologischen Untersuchungsmethoden des Klappengewebes erläutert.

### **2.1. Methoden**

Zunächst wird eine kurze Ausführung des Herstellungsprozesses des Stents und des Implantationsverfahrens vorgenommen, da diese Arbeitsschritte nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt oder modifiziert wurden. Für eine ausführliche Darstellung wird auf die Dissertationsschriften von Johannes Bethge (2009) [56] und Alain Christoph Olivier (2013) [55], durchgeführt am Lehrstuhl für Experimentelle Herzchirurgie und Herzklappenersatz der CAU zu Kiel, verwiesen. Die histologischen und immunhistochemischen Verfahren werden umfassend ausgeführt, da diese die Schwerpunkte dieser Dissertation darstellen.

#### **2.1.1. Herstellung der tissue-engineerten Klappe**

Der erste Schritt in der Herstellung des Stents beinhaltete das Auskleiden mit ovinem Dünndarm und das Einnähen einer porcinen Schweineklappe. Anschließend folgte die Dezellulierung und die Besiedlung mit autologen ovinen Endothelzellen und glatten Muskelzellen.

##### **2.1.1.1. Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden männliche und weibliche Schafe mit einem Gewicht zwischen 30 kg und 50 kg (Tabelle 9) verwendet. Die tierexperimentelle Studie stimmte mit den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes überein, wurde mit dem Tierschutzbeauftragten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Herrn Prof. G. Schultheiß, geplant und von dem Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein am 02.07.2009 genehmigt; AZ: 313-72241.121-6 (41-4/07) (Antragsstellung 20.04.2009).

### **2.1.1.2. Klappentragender Nitinol-Stent**

Nitinol ist eine Formgedächtnislegierung, welche sich aus Nickel (55 %) und Titan (45 %) zusammensetzt. Neben dem Shape-Memory-Effekt zeichnet diese Metalllegierung eine hohe Korrosionsbeständigkeit, Superelastizität, Festigkeit und Biokompatibilität aus. Die Herstellung erfolgte durch die Firma Nitinol Devices & Components Inc., Fremont, CA, USA. In dieser Studie wurde eine tubuläre und konische Form des Stents mit einer Länge von 35 mm verwendet. Mittels einer präoperativen echokardiographischen Untersuchung wurde der Durchmesser des Klappenringes und des Pulmonalarterienstammes des Tieres vor der Implantation festgestellt. Der Nitinol-Stent entfaltet sich selbstständig, sodass keine weiteren Hilfsmittel, wie z.B. ein Ballon, angewendet werden mussten, wodurch eine mögliche Schädigung der Klappe vermieden wurde.

Zum Schutz der Klappe innerhalb des Stents wurde Mukosa des Dünndarms eines Schafes verwendet. Der Dünndarm wurde von regionalen Schlachthöfen bezogen (Schlachthof Petersen, Wankendorf, Deutschland). Zur Vorbereitung wurde das Dünndarmpräparat mehrfach mit Betaisodona und einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gespült und anschließend in einer PBS/Penicillin/Streptomycin-Lösung eingefroren. Bevor der Dünndarm weiterverwendet werden konnte, wurde nach dem Auftauen überschüssiges Bindegewebe entfernt und das Dünndarmpräparat in absoluten Alkohol eingelegt. Dieser Vorgang diente zur Stabilisierung des Gewebes, um beim anschließenden Einnähen in den Stent mögliche Risse zu vermeiden. Die Befestigung der Mukosa innerhalb des Nitinol-Stents erfolgte mit Einzelknopfnähten am Stentgerüst (Nahtmaterial aus Polypropylen, Größe 6-0).

### **2.1.1.3. Das Grundgerüst**

Die Grundlage für die im weiteren Prozess benötigten Herzklappen lieferten Schweineherzen, welche von einem regionalen Schlachthof bezogen wurden (Hofschlachtereier Muhs, Krummbek, Deutschland). Die Pulmonalklappe mit Anteilen des pulmonalarteriellen Hauptstammes und des rechtsventrikulären Ausflusstraktes wurde mit einer Präparationsschere herausgeschnitten und anschließend zur Desinfizierung in Betaisodona eingelegt. Nach einer Spülung mit einer sterilen NaCl-Lösung (0,9 %) wurden die Pulmonalklappen vorsichtig herauspräpariert. Hierbei wurde das muskuläre Gewebe vollständig entfernt, sodass nur noch Klappengewebe vorhanden war. Der pulmonalarterielle Hauptstamm wurde auf einen 1 mm

breiten Rand über den Segeln gekürzt, der zum Festnähen diente. An den Kommissuren wurde ebenfalls ein 5 mm langer Steg zur Nahtbefestigung stehen gelassen.

Im Anschluss wurden die Klappen in den mit Dünndarmmukosa ausgekleideten Stent positioniert und mittels Einzelknopfnähten (Nahtmaterial aus Polypropylen, Größe 6-0, Ethicon) befestigt. Nach Fertigstellung des Stents wurde dieser in eine Antibiotikallösung (Tab. 2) bei 4 °C in einem Kühlschrank eingelegt.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der Antibiotikallösung

Bestandteile	Menge
Amphotericin B 50 mg	4,0 ml
Aqua ad iniectabilia	181,6 ml
Gentamicin 40 mg	0,4 ml
Metronidazol 500 mg	8,0 ml
Piperacillin 2 g	2,0 ml
Staphylex 1g	4,0 ml

#### 2.1.1.4. Die Dezellularisierung

Zur Entfernung des antigenischen Potentials des Gewebes wurde der hergestellte Herzklappenstent dezellularisiert. Es wurde eine Lösung aus Trypsin (0,05 %) und EDTA verwendet, die native Zellmembranen schädigt und somit ein Ablösen der nativen Zellen von der porcinen Klappe bewirkt. Das Stentgerüst mit eingenähter Pulmonalklappe wurde hierzu in 100 ml Lösung bei einer Temperatur von 37 °C und Rotationsbewegungen für 12 h eingelegt. Es folgte eine Spülung mit PBS und eine weitere Inkubation in 100 ml Antibiotikallösung für weitere 24 h bei 37 °C. Dieser Arbeitsschritt diente dem Herauswaschen der noch im Gewebe verbliebenen Zellen.

#### 2.1.1.5. Entnahme der A. carotis

Zur Gewinnung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen für die nachfolgende Besiedlung der Klappe wurde dem Versuchstier eine A. carotis entnommen. Der operative Eingriff erfolgte in Vollnarkose, gemäß den Tierschutzrichtlinien, und die Vitalparameter wurden regelmäßig und während des gesamten Eingriffes überwacht. Nachdem das Schaf in Rücken-

lage fixiert, der Kopf nach links gewendet und das Operationsgebiet geschoren und desinfiziert wurde, folgte die sterile Abdeckung. Nach Ertasten des Pulses erfolgte ein Hautschnitt und die Arteria carotis dextra wurde auf einer Länge von 8 cm freipräpariert. Das Absetzen des proximalen und distalen Gefäßanteils sowie der Gefäßabgänge mit Ligaturen ermöglichte die Entnahme des Gefäßabschnittes, welches nach Halbierung in ein Röhrchen mit sterilem Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) eingelegt wurde. Es wurde eine lokale Blutstillung durchgeführt, die Wunde mit Subkutan- und Kutannähten verschlossen und anschließend verbunden. Die gewonnenen Präparate wurden in DMEM bei 4 °C in das Zellkulturlabor transportiert.

### **2.1.1.6. Gewinnung der Endothelzellen und glatten Muskelzellen**

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Zur Gewinnung der Endothelzellen wurde das gewonnene Präparat mit einer Collagenase-Lösung (0,02 g Collagenase A in 10 ml 2 %iger Phosphatpufferlösung) gefüllt und für 20 Minuten in einem Inkubator bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Spülung des Gefäßes mit DMEM in einem Reaktionsgefäß, welches anschließend für 5 Minuten bei 20 °C und 1200 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Zellkulturmedium (DMEM, 4,5 % Glucose, 10 % fetalem Kälberserum, 1 % Streptomycin und *Fibroblast Growth Factor*) aufgenommen und anschließend in eine mit Gelatine beschichtete Zellkulturplatte gegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 4 Tage. Nach erfolgtem Wechsel des Mediums wurden die Zellen weiter inkubiert und das Medium im Verlauf zwei Mal wöchentlich gewechselt.

Für die Gewinnung der glatten Muskelzellen wurde zunächst überschüssiges Bindegewebe entfernt und die Arterie mit DMEM gespült. Anschließend wurde das Gefäß geöffnet und in 1x1 mm große Stücke geschnitten, die in einer 6-Well-Platte mit Zellkulturmedium (siehe oben) bei 37° C für sieben Tage inkubiert wurden. Nach einer Woche erfolgte ein Wechsel des Mediums. Je nach Geschwindigkeit des Auswachsens der Zellen wurden die Gefäßstücke nach zehn bis vierzehn Tagen entfernt. Das Medium wurde im Verlauf zwei Mal wöchentlich gewechselt.

Bei beiden Verfahren konnte mikroskopisch nach vier bis fünf Tagen ein Zellwachstum beobachtet werden.

### 2.1.1.7. Die Besiedlung der Stents

Die Zellbesiedlung des dezellularisierten Grundgerüsts mit glatten Muskelzellen und Endothelzellen wurde in zwei Abschnitte unterteilt:

- statische Besiedlung
- dynamische Kultivierung

Im Rahmen der statischen Besiedlung wurden zunächst die glatten Muskelzellen als Zellsuspension (ca. 2,4 Mio. Zellen) mit einer Pipette auf das Grundgerüst getropft und bei 37 °C für 6 Tage inkubiert.

Um optimale Wachstumsbedingungen für die glatten Muskelzellen zu generieren und gleichzeitig *in vivo*-Flussbedingungen zu simulieren, wurde ein Bioreaktor der Firma JEN.meditec GmbH (Jena, Deutschland) in Zusammenarbeit mit der Firma MED TEC (Schacht-Audorf, Schleswig-Holstein, Deutschland) als Grundlage der dynamischen Kultivierung herangezogen. Der Aufbau des Bioreaktors wird im Folgenden kurz zusammengefasst.

Innerhalb eines Glaszylinders, der mit Nährflüssigkeit gefüllt war, wurde der klappentragende Stent oberhalb einer Kunststoffscheibe in einer Halterung fixiert. In der Mitte der Scheibe war eine Ventilklappe eingebaut, die dem Stent bei Bewegung einen unidirektionalen Strom zuführte. Der gesamte Vorgang wurde computergesteuert für 16 Tage durchgeführt. Das Nährmedium wurde alle 2 Tage aufgefüllt.

Nach Abschluss der Besiedlung der glatten Muskelzellen erfolgte die statische Besiedlung der Endothelzellen. Hierzu wurde die Zellsuspension der Endothelzellen auf die klappentragenden Stents pipettiert und bei 37° C in einem Nährmedium (DMEM) inkubiert.

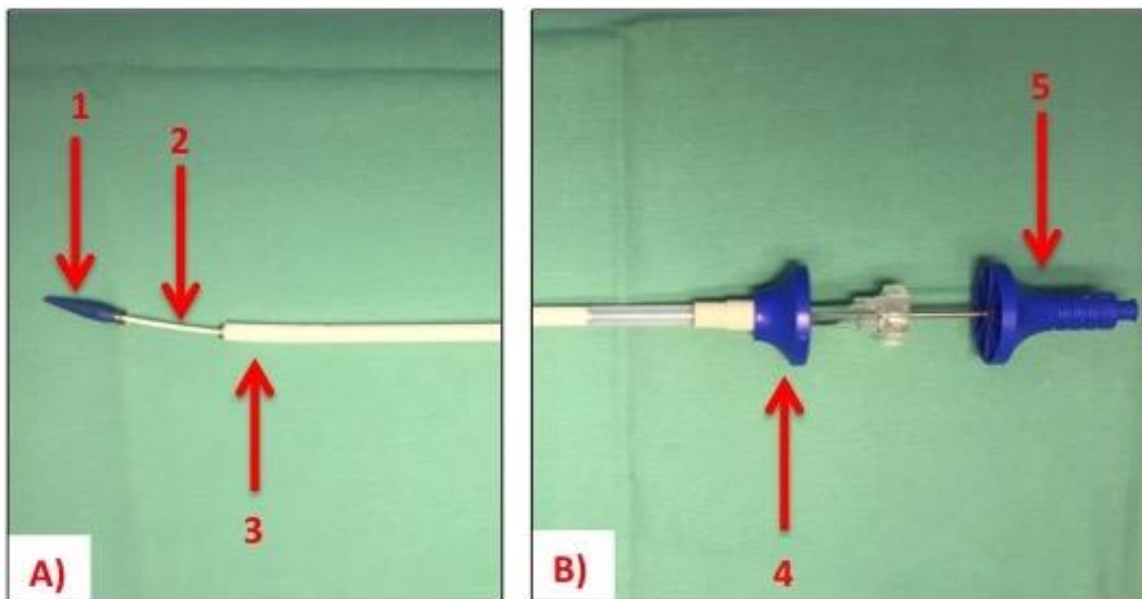


## 2.1.2. Minimal invasive perkutane Implantation

### 2.1.2.1. Das Kathetersystem

In Kooperation mit der Firma MED TEC (Schacht-Audorf, Schleswig-Holstein, Deutschland) wurde das Optilook®-Kathetersystem für dieses Forschungsprojekt entwickelt. Funktionell ist dieses System in drei Komponenten zu unterteilen.

An der Katheterspitze befindet sich hinter einer distalen Olive (Abb. 4 A1) ein Hohlraum, in dem der Stent in zusammengefaltetem Zustand eingebracht wird (Abb. 4 A2). Weiter proximal dieses Hohlraumes befindet sich im Hohlraum unter der äußeren Führungshülse der sogenannte „Pusher“ (Abb. 4 A3), eine flexible Metallspirale, die durch Vorschub des hinteren Griffes (Abb. 4 B5) den Stent aus der Führungshülse treibt. Die Gesamtlänge beträgt 120 cm und der Gesamtdurchmesser misst 22 French (F) (7,3 cm).



**Abbildung 4: Verkleinerte Darstellung des Kathetersystems.** A) Distaler Teil mit Gummi-Olive (1), Hohlraum für den Stent (2) und Pusher (3). B) Proximaler Teil mit vorderem (4) und hinterem Griff (5).

### **2.1.2.2. Vorbereitung der Implantation**

Die Versuchstiere wurden im Tierstall mit einer intramuskulären Injektion von Xylazin (Rompun) 0,02-0,1 mg/kg KG und 5-10 mg/kg KG Ketamin (Ketanest) sediert und anschließend in den Tierversuch-Operationsaal gebracht. Dort wurde ein intravenöser Zugang über eine Ohrvene etabliert und ein Bolus Propofol (Dosierung: 2 mg/kg KG) verabreicht. Die Intubation erfolgte auf dem Operationstisch, hierfür wurden mit Hilfe eines Laryngoskopes ein Endotrachealtubus (Durchmesser 6-8 mm) eingebracht und sichere Intubationszeichen geprüft. Um eine Pansenüberblähung zu verhindern, wurde eine Pansensonde gelegt und das Tier nun in Rückenlage gelagert und fixiert. Anschließend erfolgte die Rasur beider Leistenregionen. Zur Überwachung der Vitalfunktionen des Tieres wurden EKG-Elektroden platziert und eine Pulsoxymetrie abgeleitet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit einer Propofol-Infusion (Dosierung: 20 mg/kg KG/h) und Ketamin-Bolusgabe (2-2,8 mg/kg KG). Anhand der kontinuierlichen Überwachung konnte eine individuelle Anpassung der Narkosetiefe ermöglicht werden. Das Atemzugvolumen der maschinellen Beatmung wurde auf 10-13 ml/kg KG bei 12-18 Atemzügen/Minute eingestellt und durch Überprüfung der Vitalparameter, der expiratorischen CO<sub>2</sub>-Konzentration und mehrfachen arteriellen Blutgasanalysen bei Bedarf angepasst. Weiterhin wurde Volumen in Form von Ringerlösung (Dosierung: 10-20 ml/kg KG) substituiert sowie eine antibiotische Prophylaxe mit 1,5 g Cefuroxim als Infusion verabreicht. Präoperativ wurde eine echokardiographische Untersuchung zur Bestimmung des Durchmessers der Pulmonalklappenebene durchgeführt, um den optimalen Stent für das nachfolgende Implantationsverfahren auszuwählen.

### **2.1.2.3. Die Implantation**

Nach gründlicher Desinfektion wurden beide Leisten mit Lochtüchern steril abgedeckt und durch Punktion der linken A. femoralis eine 5F-Schleuse zur Bestimmung des arteriellen Blutdruckes eingelegt. Die Venae femorales wurden ebenfalls punktiert und 9F-Schleusen (Terumo®, Radiofocus®, Tokyo, Japan) eingebracht. Zur Durchführung einer Angiographie des rechten Herzens wurden ein Messkatheter (Cook®, Aurous®, Bjaeverskov, Denmark) und ein Angiographiekatheter (Cordis®, Johnson & Johnson, Tokyo, Japan) in die V. femoralis eingeführt. Der nächste Schritt beinhaltete das Einbringen eines Führungsdrahtes, der in die Pulmonalarterien vorgeschoben wurde.

Es wurden 200 IE/kg KG Heparin unmittelbar vor der Implantation verabreicht und der Stent in den Katheter eingesetzt. Zuletzt kam es zum Austausch der 9F-Schleuse durch eine 24F-Schleuse, damit das Applikationssystem über den Führungsdraht in die rechte V. femoralis eingeführt werden konnte. Mittels Durchleuchtung wurde der Applikationskatheter bis in die A. pulmonalis vorgeschoben und der Stent auf Klappenebene freigesetzt. Anschließend wurde der Katheter vorsichtig zurückgezogen und durch die Gabe von Kontrastmittel das Implantationsergebnis überprüft. Es folgte die Antagonisierung der Heparinisierung mit Protamin. Nach Entfernung der Schleusen in der Leiste wurden die Punktionsstellen für 30 Minuten komprimiert und das Gefäß mit einer Einzelknopfnahnt vernäht.

Nach Implantation wurden die Versuchstiere im universitären Tierstall postoperativ versorgt und beobachtet. Es erfolgten regelmäßige klinische und apparative (Echokardiographie) Untersuchungen teilweise mit medikamentöser Unterstützung. Nach Ablauf des geplanten Beobachtungszeitraumes oder bei offensichtlicher Verschlechterung des klinischen Status wurden die Versuchstiere euthanasiert und das Herz explantiert.

## **2.2. Histochemische und immunhistochemische Färbemethoden**

Zur Analyse der Besiedlung und der Klappenmatrix wurden sowohl Übersichts-/ Bindegewebsfärbungen als auch immunhistochemische Färbungen angefertigt. Im Folgenden werden die Färbeprozesse näher dargestellt.

### **2.2.1. Paraffin-Einbettung und Anfertigung der Schnitte**

Die explantierten Herzklappen wurden zur Fixierung in 4 %igem Formalin bei 20 °C für 72 h eingelegt. Zur Entfernung des Formalins folgte eine Spülung mit H<sub>2</sub>O. Die Klappen wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 % Ethanol) dehydriert und in einer Blockform in Paraffin eingebettet. Damit im Schneideprozess mit einem Mikrotom (Leica RM 2155, Leica, Wetzlar, Deutschland) eine Schnittdicke von 3 µm erzielt werden konnte, mussten die Schnitte vorher gekühlt werden. Die angefertigten Schnitte wurden auf einen SUPERFROST ULTRA PLUS<sup>®</sup> Objektträger (Menzel GmbH) gezogen und bei 37 °C in einem Wärmeschrank getrocknet.

### **2.2.2. Bindegewebsfärbungen**

Bevor anhand immunhistochemischer Färbungen die Besiedlungszellschicht spezifisch untersucht wurde, erfolgten die im Nachfolgenden dargestellten Übersichtsfärbungen zur Beurteilung des Bindegewebes und der Struktur der Klappe. Die histologischen Standardfärbungen (H.E.- und M.P.-Färbung) und die Versilberungsfärbung nach Von-Kossa begannen jeweils mit der Entparaffinierung in Xylol für 15 Minuten und der Überführung in wässriges Milieu mit einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 80 % und 70 % Ethanol). Als letzter Schritt der Färbungen erfolgten die Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 % und 96 % Ethanol, jeweils 5 Minuten) und eine Inkubation in Xylol für 15 Minuten, bevor die Schnitte mit Eukitt eingedeckt wurden. Diese Arbeitsschritte waren allen Färbungen gemeinsam.

#### **2.2.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)**

Bevor der Schnitt für 1 Minute in eine Mayers-Hämalaun-Lösung inkubiert wurde, spülte man den Objektträger mit destilliertem Wasser. Das anschließende Bläuen der Probe erfolgte unter H<sub>2</sub>O für 20 Minuten. Dann wurde eine Färbung mit einer Eosin-Lösung (0,5 % Eosin G + 0,25 ml Essigsäure) durchgeführt und der Schnitt in destilliertem Wasser zur Reinigung überflüssiger Farbrückstände gewaschen. Die Färbeergebnisse stellten sich wie folgt dar: Zellkerne blauschwarz bis violett, Plasma rosa bis rot und Kollagen rot.

#### **2.2.2.2. Movat-Pentachrom-Färbung (M.P.-Färbung)**

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte eine zwanzigminütige Färbung mit 1 %igem Alcianblau. Anschließend wurde der Schnitt fünf Minuten mit Leitungswasser gespült und für eine Stunde in alkalischem Alkohol (Ammoniak + 96 %igem Ethanol) inkubiert. Um den Alkohol vollständig zu entfernen, wurde mit H<sub>2</sub>O und anschließend mit destilliertem H<sub>2</sub>O jeweils 10 Minuten gespült. Der nächste Arbeitsschritt beinhaltete die Inkubation in Resorcinfuchsin für 15 Minuten. Nach wiederholter Spülung mit H<sub>2</sub>O schloss sich eine zweiminütige Differenzierung in 2 %igem Eisenchlorid und eine einminütige Fixierung in 5 % Natriumthiosulfat an. Im Anschluss an die fünfminütige Färbung mit Crocein-Scarlet-Säurefuchsin folgte eine wiederholte Spülung mit H<sub>2</sub>O und destilliertem H<sub>2</sub>O. Die Schnitte wurden fünfmal in einer 0,5 %igen Essigsäure fixiert, zur Differenzierung in 5 %iger Phos-

phorwolframsäure für 5 Minuten inkubiert und wiederum fünfmal in 0,5 %iger Essigsäure fixiert. Danach wurde der Schnitt in absolutem Alkohol gewaschen und für 20 Minuten in Saffron-Lösung inkubiert. Anschließend wurde der Schnitt nach Durchlaufen der Dehydrierung eingebettet.

Die Färbeergebnisse stellten sich wie folgt dar: Muskulatur färbte sich rot, Kerne und elastische Fasern schwarz, Kollagen und retikuläre Fasern gelb, Mucin und Grundsubstanz blautürkis und Fibrin intensiv rot.

### **2.2.2.3. Von-Kossa-Färbung**

Nach einer fünfminütigen Inkubation in destilliertem H<sub>2</sub>O erfolgte die Inkubation in 5 %igem Silbernitrat mit Lichtexposition für drei Stunden. Anschließend wurden die Schnitte wiederum in destilliertem H<sub>2</sub>O von überschüssigen Färberückständen gereinigt und zur Entwicklung für 2 Minuten in 1 %igem Pyrogallol inkubiert. Die Fixierung des Schnittes erfolgte in 5 %igem Natrium-Thiosulfat für 5 Minuten. Nach einer zehnminütigen Spülung unter fließendem H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte mit Kernechtrot gegengefärbt und nach Beseitigung der überflüssigen Färberückstände mit destilliertem H<sub>2</sub>O eingedeckt. Vorhandene Kalziumdepots färbten sich schwarz.

### **2.2.3. Immunhistochemische Färbung**

Es wurde die N-Histofine® Simple Stain Max PO (Multi) (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) Färbereagenz zur immunhistochemischen Färbung verwendet. In diesem Verfahren wird ein universelles Immun-Enzym Polymer, das aus einer Kombination von Aminosäuren sowie Peroxidase besteht und mit Fab'-Fragmenten sekundärer Antikörper bestückt ist, mit Anti-Maus- und Anti-Kaninchen-Immunglobulinen als Primärantikörper verbunden. Die Primärantikörper binden an spezifische Antigene (Epitope) der Zelloberfläche, welche wiederum in der Fc-Region vom Immun-Enzym-Polymer erkannt und gebunden werden. Das hinzugefügte Chromogensubstrat wird enzymatisch von der Peroxidase lokal in einen Farbstoff umgewandelt, der im Bereich der Primärantikörperbindung sichtbar wird.

Zu Beginn dieser Färbemethode erfolgten eine Entparaffinierung mit Xylol und eine Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe. Nach einer Spülung mit destilliertem H<sub>2</sub>O erfolgte die Demaskierung der Epitope durch eine fünfzehnminütige Inkubation in Citratpuf-

fer (pH 6.0; 2,1 g/l) bei 95-100 °C. Zur Hemmung der Peroxidasen wurden die Schnitte nach Abkühlung für 10 Minuten in einer 3 %igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-/Methanol-Lösung inkubiert und anschließend in destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Um endogene Bindungsstellen zu blockieren, wurde 100 %iges Ziegen Serum auf die Schnitte gegeben, für eine Stunde in eine feuchte Kammer inkubiert und das Serum anschließend abgetropft. Durch Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht in PBS-verdünntem Antikörper (1:100) (siehe Tabelle 7) erfolgte die Bindung an die spezifischen Antigene auf den Zelloberflächen.

Nach weiterem Waschen mit PBS wurde N-Histofine Simple Stain Max PO Multi aufgetragen und die Schnitte für 45 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte das Waschen mit PBS und 10 µl Chromogen Substrat Reagenz wurden auf den Schnitt gegeben. Nach wiederholtem Waschen mit PBS erfolgte die Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun Lösung in einer Glasküvette für 3 Minuten und Bläuen des Schnittes unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten. Vor der Eindeckung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in ein Xylol-Bad gestellt.

### **2.2.4. Begutachtung der Schnitte**

Zur bildlichen Darstellung der gefärbten Schnitte wurde das Axiovert 135 Lichtmikroskop (Zeiss, Deutschland) mit Objektiven für eine 10-, 20- und 32-fache Vergrößerung benutzt. Nach ausführlicher Betrachtung wurden relevante Bildausschnitte mit einer AxioCam ICc 1 (Zeiss, Deutschland) fotografiert und gleichzeitig durch Übertragung auf einen Computer digitalisiert. Als Software für die Bedienung der Kamera und Bearbeitung der Bilder diente das Programm AxioVision® Release 4.8.2 (Zeiss, Deutschland).

Für die Bindegewebsfärbungen wurde im folgenden Ergebnisteil eine rein deskriptive Beschreibung der zu sehenden Strukturen und Pathologien vorgenommen. Bei der Beurteilung der Von-Kossa-Färbung und der immunhistochemischen Färbungen hingegen wurde eine Gradeinteilung zur einfacheren Vergleichbarkeit der Klappen vorgenommen. Die Gradeinteilung wurde bei Färbemethoden von Grad 0 bis Grad IV festgesetzt. Die Abwesenheit von Muskelzellen in der Aktinfärbung entsprach Grad 0, der Nachweis regelmäßig infiltrierender Muskelzellen Grad IV. Das Fehlen CD31 positiver Zellen (Endothelzellnachweis) wurde mit der Einteilung in Grad 0 vorgenommen, eine deckende regelmäßige Zellschicht mit Grad IV.

Bei der Silberfärbung beschreibt Grad 0 keinen Nachweis von Verkalkungen, wohingegen ausgeprägte Verkalkungen der Schnitte in Grad IV eingeteilt wurden.

**Tabelle 3:** Gradeinteilung zur Evaluation der gefärbten Schnitte

	Grad 0	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
Aktin	Kein Zellenachweis	Einzelne oberflächliche Zellen	Oberflächlich deckend	Einzelne infiltrierende Zellen	Regelmäßig infiltrierende Zellen
CD31	Kein Zellenachweis	Einzelne Zellen	Vereinzelte Ansammlungen	Disseminiert unregelmäßiger Zellenachweis	Regelmäßig deckende Zellschicht
Von-Kossa	Keine Verkalkungen	Vereinzelte Verkalkungen	Zahlreiche, aber räumlich begrenzte Verkalkungen	Starke, große Verkalkungen	Verkalkung des gesamten Schnittes

### 2.2.5. Makroskopische Beurteilung der explantierten Klappen

Anhand folgender Kriterien wurde der Zustand der explantierten Klappen makroskopisch beurteilt:

- Position des Stents im RVOT
- Entzündungszeichen im Stentbett
- Makroskopische Beschaffenheit der Segel (Retraktion, Adaptation und Entzündungen)
- Hinweise auf eine Endokarditis (Vegetationen)

## 2.3. Materialien

**Tabelle 4:** Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur

Produkt	Hersteller
Amphotericin B	X-Gen Pharmaceuticals, NY, USA
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, DE
Aqua bidest	UKSH
Betaisadona Lösung	Mundipharma GmbH, Limburg, DE
Collagenase A	Roche, Mannheim, DE
Cryo-SFM	PromoCell, Heidelberg, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	PromoCell, Heidelberg, DE
Gelantine Typ A	Sigma-Aldrich, MO, USA
Gentamicin 40 mg	Ratiopharm, Ulm DE
rhFGF, Basic Human 25 mg	Promega, WI, USA
HANK'S Solution	Biochrom AG, Berlin, DE
Metronidazol 500 mg	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE
NaCl 0,9 %	Braun, Melsungen, DE
Penicillin/Streptomycin (10000 U / 10000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, DE
Piperacillin 2 g	Ratiopharm, Ulm, DE
Refobacin 40 mg	Merck, Darmstadt, DE
Staphylex 1 g	GlaxoSmith Kline, Brentford, UK
Trypsin/EDTA Solution (0,5 %/0,02 % in PBS)	Biochrom AG, Berlin, DE
Medium für Zellkultur DMEM (High glucose 4,5 g/L)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE



Tabelle 5: Geräte

Produkt	Hersteller
Brutschrank Cell House 150	Heto, DK
Brutschrank Hera Cell 150	Heraeus, Hanau, DE
Sterile Werkbank, Lamina Air HB	Heraeus, Hanau, DE
Zentrifuge - Megafuge 20 R	Heraeus, Hanau, DE
Gefrierschrank -40 °C	Liebherr, Kirchdorf, DE
Gefrierschrank	Liebherr, Kirchdorf, DE
Kühlschrank	Liebherr, Kirchdorf, DE
Präzisionswaage UMC 5	Sartorius, Göttingen, DE
Wasserbad	Gesellschaft für Labor- technik, Burgwedel, DE
Rüttler-Vf 2	Jahnke und Kunkel, Stau- fen, DE
Bioreaktor	JEN.meditec, Jena, DE
Mikroskop ID 03	Zeiss Germany, Jena, DE

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6 Lochplatten und 24 Lochplatten	Bio-one, Frickenhausen, DE
Petrischalen	Bio-one, Frickenhausen, DE
Zellkulturflasche 25 und 75 cm <sup>2</sup>	BD Biosciences, CA, USA
Nahtmaterial Prolene 6-0 und 7-0	Ethicon, NJ, USA
Nahtmaterial Mopylen 6-0 und 7-0	Resorba Medical GmbH, Nürn- berg, DE
Einwegskalpelle	Socorex, Ecub
Spritzen 2/5/10/20	Braun, Melsungen, DE
Kanülen	Braun, Melsungen, DE
OP-Abdecktücher	Walter CMP, Kiel, De
Pipetten 5/10/25 ml	Th. Geyer GmbH, Renningen, DE
Pipettenspitzen 10, 100 und 1000 µl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Minisart-Filter 0,45 µm	Satorius GmbH, Göttingen, DE
Anatomische Pinzette	UKSH, Kiel, DE
Chirurgische Pinzette	UKSH, Kiel, DE
Präparierschere	UKSH, Kiel, DE
Glasflasche Boro 100 ml	UKSH, Kiel, DE

**Tabelle 7:** Materialien und Reagenzien für die Färbeverfahren

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Xylol	Th. Geyer, GmbH & Co. KG, Renningen, DE
Ethanol	Büfa Chemikalien GmbH, Oldenburg, DE
Eosin G	Merck, Darmstadt, DE
Meyers Hämalan	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniak-Lösung 25 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Resorcin-Fuchsin-Lösung	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Alcainblau 8 GS	Waldeck GmbH, Münster, DE
Eisen-(III)-Chlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumthiosulfat 5%	Merck, Darmstadt, DE
Brilliant Crocein R (Chroma)	Waldeck GmbH, Münster, DE
Essigsäure ROTIPURAN	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Säurefuchsin	Merck, Darmstadt, DE
Phosphorwolframsäure 5 %	Waldeck GmbH, Münster, DE
Safran du Gatinais	Waldeck GmbH, Münster, DE
Silbernitrat 5 %	Merck, Darmstadt, DE
Pyrogallol 1 %	Merck, Darmstadt, DE
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
N-Histofine <sup>®</sup> DAB-3S Kit	Nichirei Biosciences, Tokyo, JP
N-Histofine <sup>®</sup> Simple Stain Max PO (Multi)- Universal immunoperoxidase Polymer, Anti-mouse and anti-rabbit-antibody	Nichirei Biosciences, Tokyo, JP
Ziegenserum	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
PBS (Phosphat Buffered Saline)	Unterschiedliche Hersteller
Eukitt <sup>®</sup> -Eindeckmittel	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, MO, USA
Objektträger Superfrost Ultra Plus	Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Deckgläser 24x50 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, DE

**Tabelle 8:** Geräte für die Auswertung und Herstellung der Schnitte

Produkt	Hersteller
Mikrotom: Leica RM 2155	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Axiocam	Zeiss, Oberkochen, DE
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE
Software: AxioVision Rel. 4.8.2	Zeiss, Oberkochen, DE
Mikrowelle Lunik 602 (600 W)	Unirop

**Tabelle 9:** Kontrollfärbungen der Klappen

Färbemethode	Positivkontrolle	Negativkontrolle
CD31 / PECAM	Skelettmuskulatur eines Schafes	Klappe ohne Antikörper
$\alpha$ -Actin	Skelettmuskulatur eines Schafes	Klappe ohne Antikörper

**Tabelle 10:** Antikörper für immunhistochemische Färbung

Antigen	Name des Antikörpers	Hersteller
CD31 / PECAM-1	PECAM-1 (M-20) Goat-IgG; 200 $\mu$ g/ml	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -Actin	Smooth Muscle Actin B4, Mouse-IgG; 200 $\mu$ g/ml	Santa Cruz Biotechnology

Tabelle 11: Tierdaten

Bezeichnung des Tieres	Gewicht	Durchmesser Pulmonalklappe	Stent	<i>In-vivo</i> -Verweildauer	Besondere Vorkommnisse
BI I	30 kg	21 mm	21 mm tubulär	4 Wochen	Der Stent war in seiner Position verrutscht.
BI II	48 kg	23 mm	26 mm tubulär	4 Wochen	-
BI III	33 kg	22 mm	24 mm tubulär	4 Wochen	-
BI IV	50 kg	22 mm	26 mm tubulär	4 Wochen	Exitus im MRT, Beatmungsschlauch war zu lang.
BI V	33 kg	22 mm	22 mm tubulär	4 Wochen	-
BI VI	33 KG	20 mm	27 mm konisch	1 Woche	Im Stall verstorben

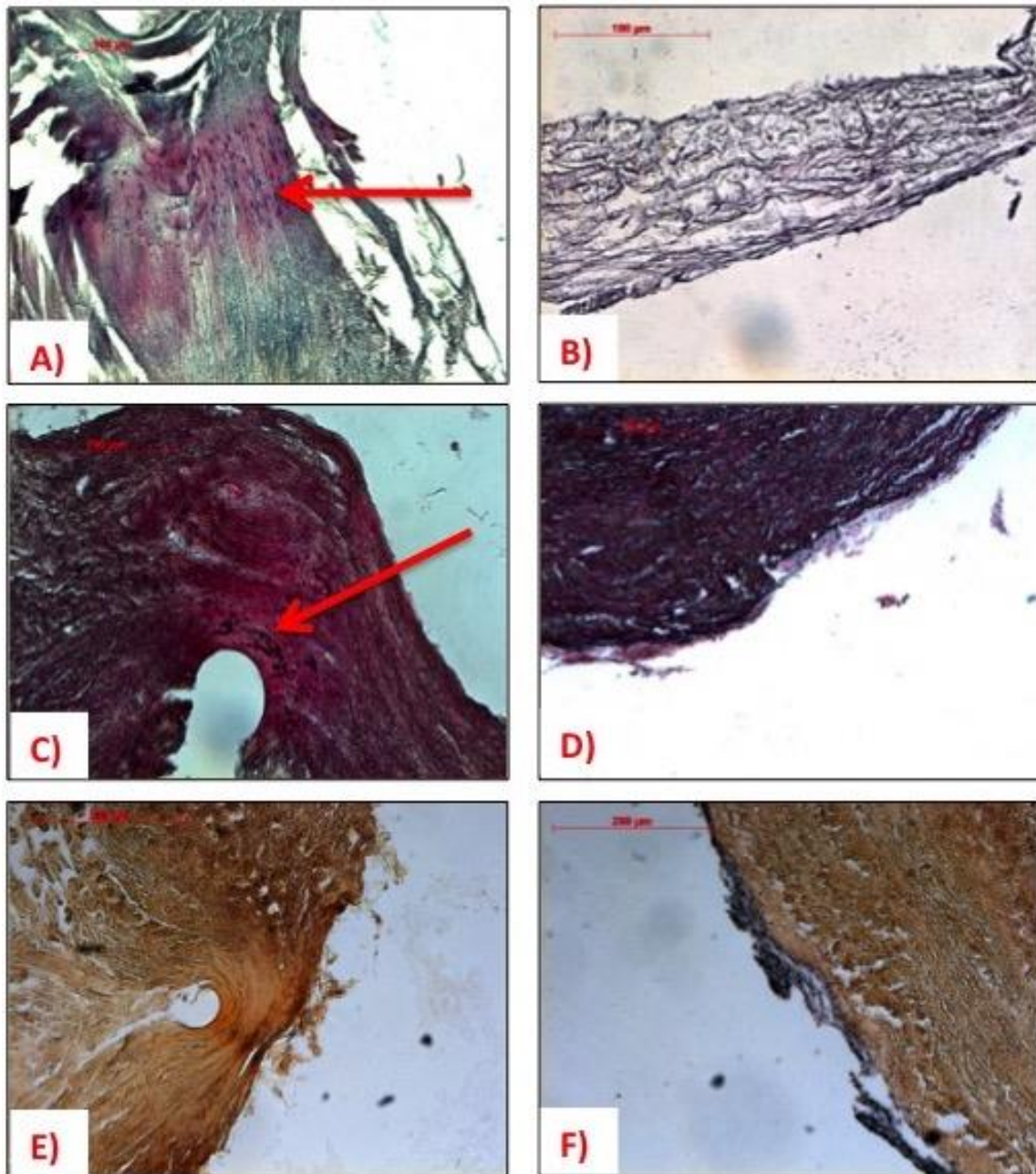
### 3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden tissue-engineerte Pulmonalklappen mittels histologischer und immunhistochemischer Färbungen untersucht, um die Produktion eines extrazellulären Gewebeverbandes und die Besiedlung der Matrix zu analysieren. Hierfür wurde eine Gruppe von implantierten Klappen mit einer *in vivo*-Verweildauer von vier Wochen mit einer Gruppe von Kontrollklappen, die parallel besiedelt, jedoch nicht implantiert wurden, verglichen. Im Folgenden werden die nicht-implantierten Klappen mit „**BN**“ (Besiedelt und nicht implantiert) und die implantierten Klappen mit „**BI**“ (Besiedelt und implantiert) bezeichnet.

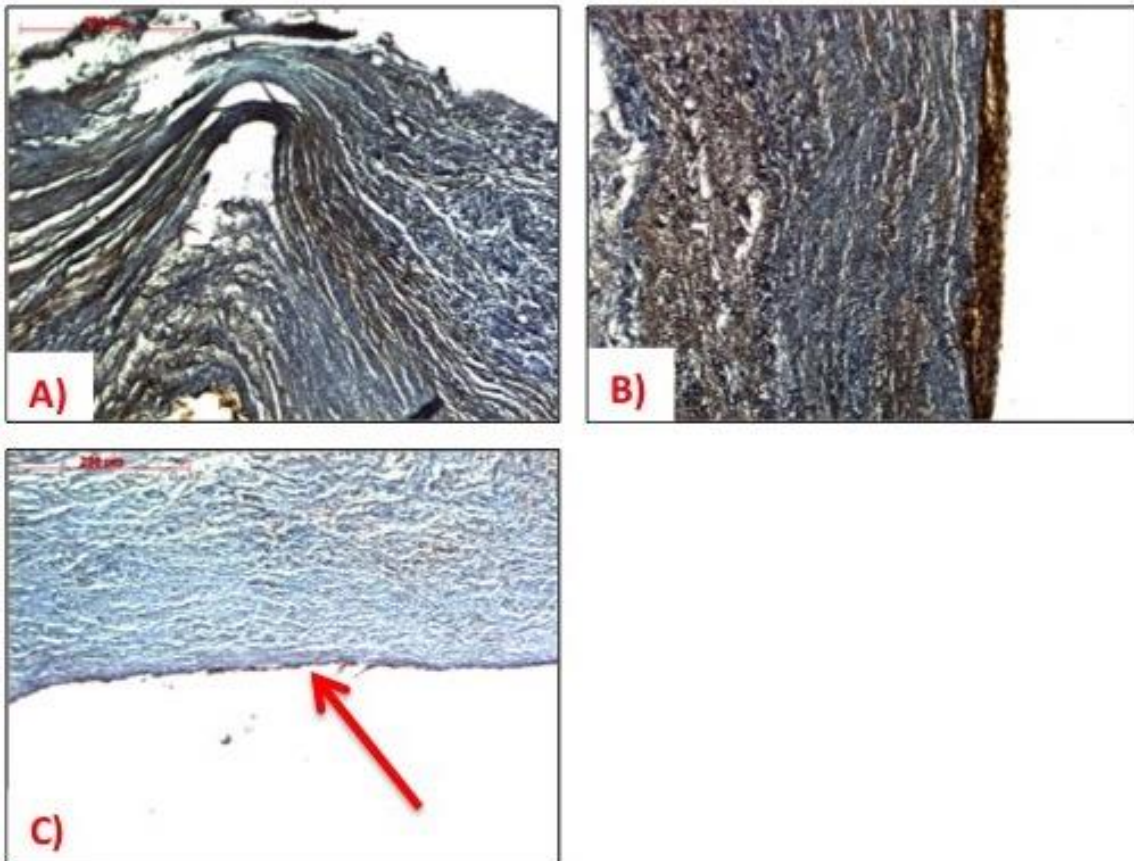
#### 3.1. Ergebnisse: Besiedelte und nicht implantierte Klappen (BN)

##### 3.1.1. Mikroskopische Auswertung

**BN 1:** Innerhalb der Klappe wurden keine Zellen nachgewiesen. Des Weiteren stellte sich das Klappengewebe aufgelockert dar (Abb. 5B). In der H.E.- und M.P.-Färbung konnten Zellen und umgebendes muskuläres Gewebe in Zugrichtung der Nahtstelle nachgewiesen werden (Abb. 5A). Eine Besiedlungszellschicht zeigte sich in der M.P.-Färbung an der Segelbasis (Abb. 5D), jedoch nicht an Segelmitte und -spitze. Die Besiedlungszellschicht setzte sich aus Mucin, Proteoglykanen und Muskelzellen zusammen. Es zeigten sich keine Verkalkungen des Klappengewebes (Grad 0), es wurden jedoch initiale Verkalkungen der Besiedlungszellschicht festgestellt (Abb. 5F). An der Segeloberfläche im Bereich der Segelbasis wurden Myofibroblasten nachgewiesen (Aktin: Grad I; Abb. 6B), die Segelmitte und -spitze waren frei von besiedelten Aktin-positiven Zellen. Innerhalb der Spongiosa in Basisnähe sowie an der Nahtstelle wurden schwache Färbungen von Aktinfasern festgestellt (Abb. 6A+B). Die Ergebnisse der Lokalisation angesiedelter Zellen in der CD31-Färbung deckten sich mit den Ergebnissen der oben aufgeführten Färbungen, da nur an der Segelbasis der Nachweis von vereinzelt Endothelzellen erbracht wurde (Grad I; Abb. 6C).



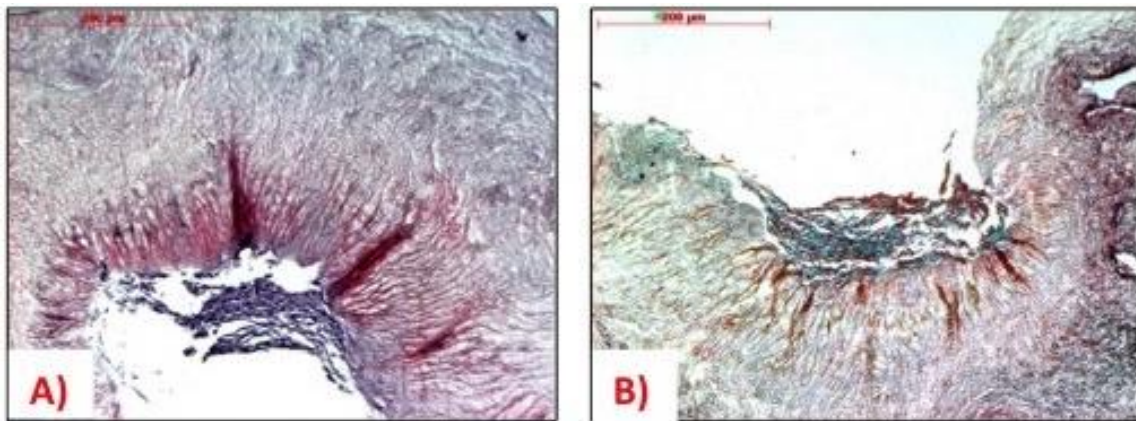
**Abbildung 5: Histologische Analyse von BN 1.** **A)** H.E.-Färbung: Nahtstelle mit Nachweis von Muskulatur (rotviolett) und Zellkernen (blau), siehe Pfeil. **B)** H.E.-Färbung: Segelmitte mit stark aufgelockelter Grundstruktur und kein Nachweis einer Besiedlungszellschicht. **C)** M.P.-Färbung: Nahtstelle an der Klappenwand mit Nachweis von Zellkernen (schwarz) in Zugrichtung zur Naht (Pfeil) sowie Muskulatur (rot) und elastischen Fasern (schwarz). **D)** M.P.-Färbung: Übergang zur Segelbasis mit Nachweis einer Besiedlungszellschicht grüner Grundsubstanz und Muskelzellen (rot). **E)** Von-Kossa-Färbung: Nachweis von Zellen in Zugrichtung zur Naht, keine Verkalkungen erkennbar. **F)** Von-Kossa-Färbung: Segelbasis mit Nachweis einer beginnenden Verkalkung der Besiedlungszellschicht.



**Abbildung 6: Histologische Analyse von BN 1.** **A)** Aktin-Färbung: Nahtstelle mit schwachen Färbungen von Aktinfasern. **B)** Aktin-Färbung: Übergang zur Segelbasis mit Nachweis von Muskelzellen innerhalb der Besiedlungszellschicht (braun) sowie schwacher Nachweis von Aktinfasern (schwach braun) innerhalb der Spongiosa. **C)** CD31-Färbung: Segelbasis mit Nachweis einer deckenden Schicht Endothelzellen (Pfeil) an der Oberfläche der Ventrikularis.

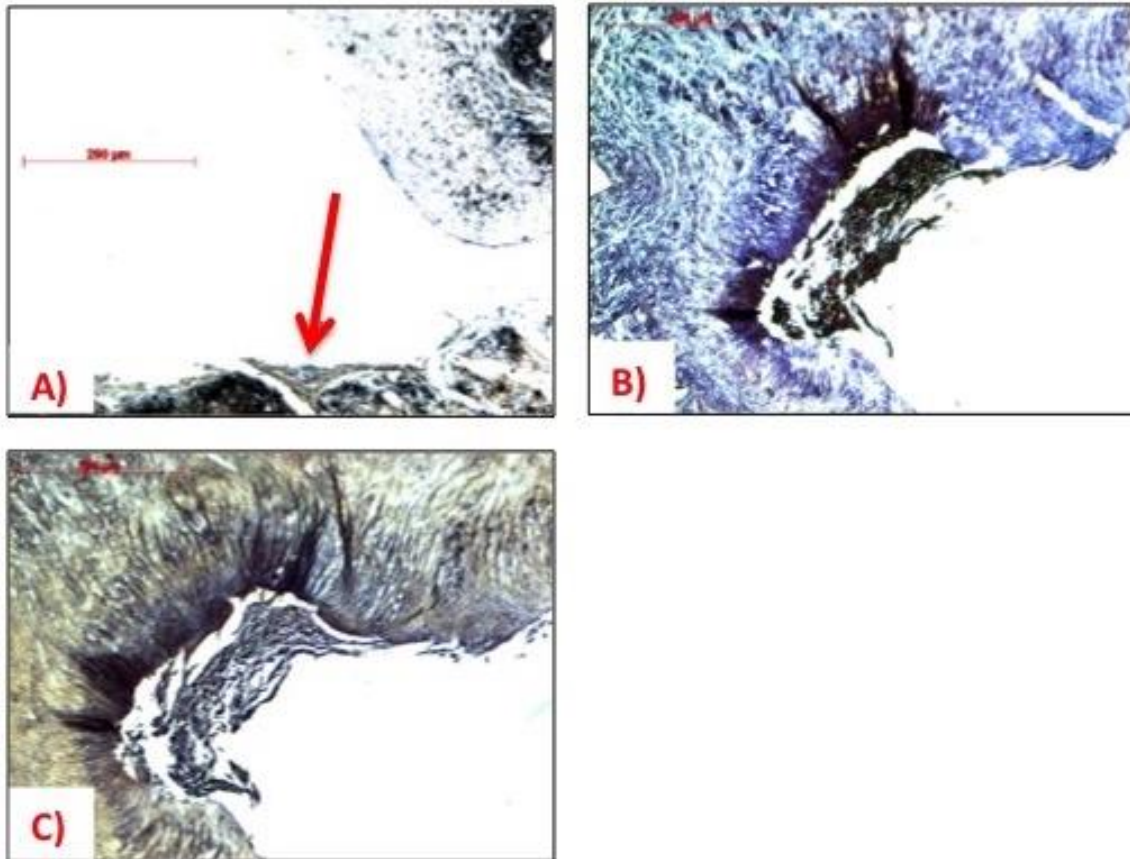


**BN 2:** Es konnte eine regelmäßige Gewebestruktur ohne größere Auflockerungen durch die Übersichtsfärbungen nachgewiesen werden (Abb. 7A+B). Im Bereich der Segelbasis und –mitte stellte sich eine mehrschichtige Besiedlungszellschicht mit Muskelzellen dar, die Segelspitzen waren zellschichtfrei. Innerhalb der Segelmatrix wurden keine Zellen nachgewiesen. Die Schnitte waren frei von Verkalkungen (Von-Kossa: Grad 0; Abb. 8A). Die Besiedlungszellschicht wies vereinzelte oberflächliche Muskelzellen auf (Aktin: Grad I; Abb. 8B), jedoch zeigten sich keine Endothelzellen (CD31: Grad 0; Abb. 8C).



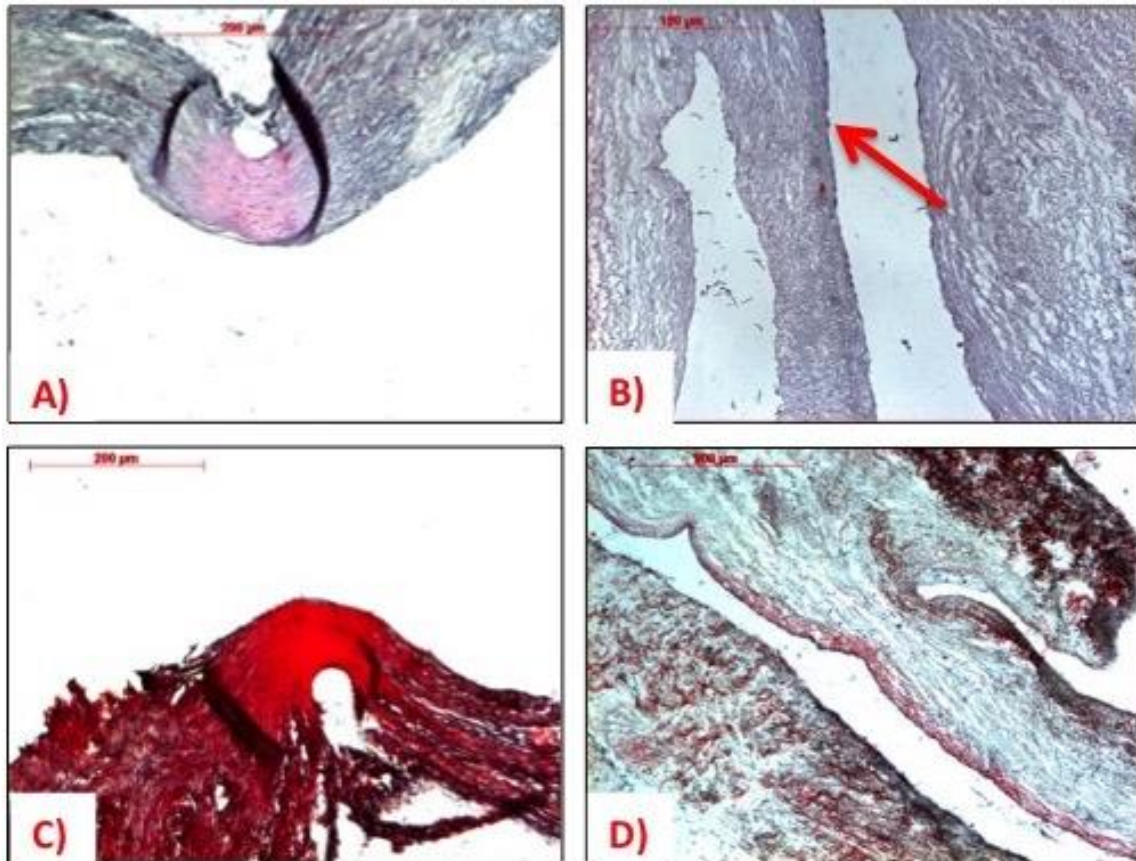
**Abbildung 7: Histologische Analyse von BN 2.** **A)** H.E.-Färbung: Segelbasis mit Nachweis einer Besiedlungszellschicht mit Zellkernen (blau). **B)** M.P.-Färbung: Segelbasis mit Darstellung einer Besiedlungszellschicht, welche sich aus Muskelzellen (rot) und einer mucinhaltigen (blau-türkis) Grundsubstanz zusammensetzt.



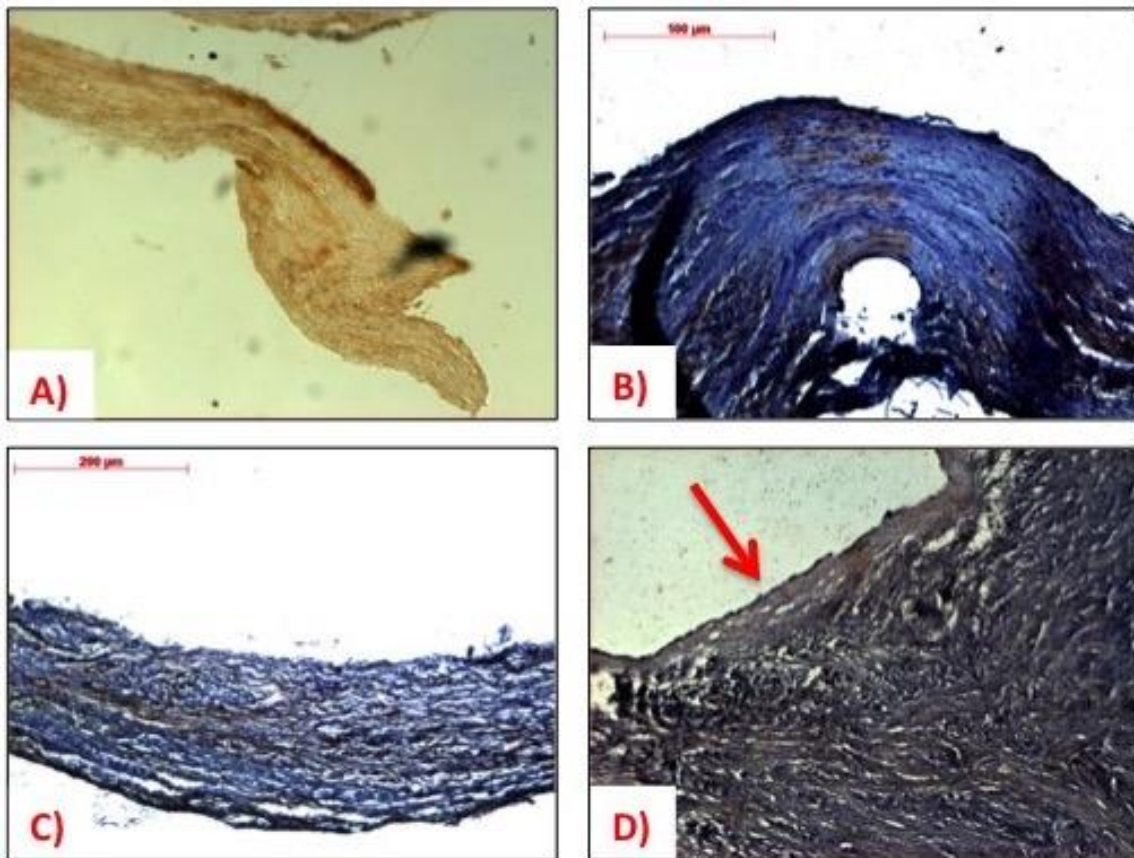


**Abbildung 8: Histologische Analyse von BN 2.** **A)** Von-Kossa-Färbung: Besiedlungszellschicht (Pfeil) an der Segelbasis ohne Verkalkungen. **B)** Aktin-Färbung: Segelbasis mit Nachweis von Muskelfasern innerhalb der Besiedlungszellschicht. **C)** CD31-Färbung: Besiedlungszellschicht an der Segelbasis ohne Nachweis von CD31-positiven Zellen.

**BN 3:** In der H.E.- und M.P.-Färbung zeigten sich Muskelzellen und muskuläres Gewebe in Zugrichtung zur Naht (Abb. 9A+B). Diese Ergebnisse deckten sich mit den Ergebnissen der Aktin-Färbung (Abb. 10B). Die Ausprägung der Besiedlungszellschicht nahm von der Segelbasis bis –spitze kontinuierlich ab, bis kein Nachweis an der Spitze mehr erbracht werden konnte. Weiterhin stellte sich eine regelrechte Gewebekonfiguration dar, ohne Auflockerungen oder Destruktionen. Es zeigten sich keine manifestierten Verkalkungen der Segel (Von-Kossa: Grad 0; Abb. 10A), im Bereich des Segelspitze wurde eine schwachbräunliche Färbung der Besiedlungszellschicht festgestellt. Neben dem Nachweis von Muskelzellen an der Nahtstelle zeigten sich schwache Färbungen von Aktinfasern in der Spongiosa der Segelmitte (Abb. 10C) und vereinzelte Muskelzellen in der Besiedlungszellschicht (Aktin: Grad I). Weiterhin wurden durch die CD31-Färbung sporadische einschichtige Endothelzellen an der Segelbasis nachgewiesen (CD31: Grad I; Abb. 10D).



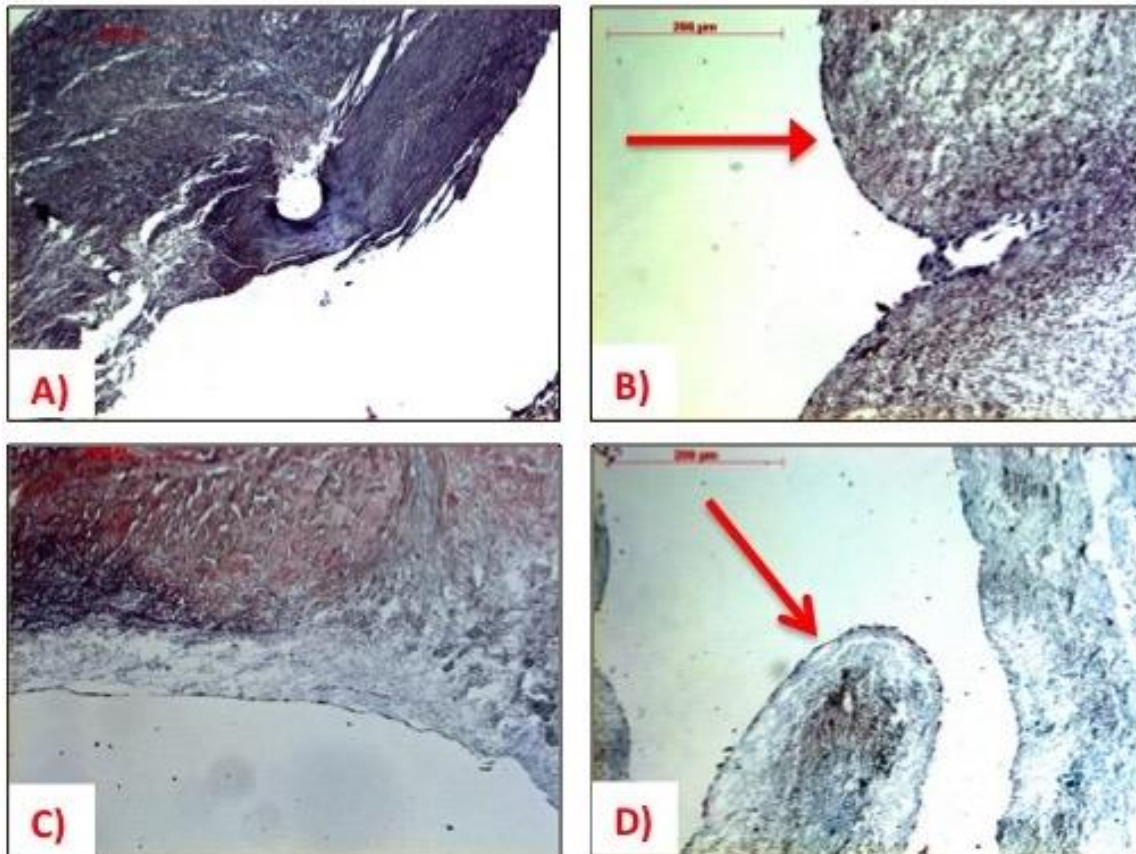
**Abbildung 9: Histologische Analyse von BN 3.** **A)** H.E.-Färbung: Nahtstelle mit Nachweis von Muskulatur (rot) und Zellkernen (blau). **B)** H.E.-Färbung: Segelmitte mit Nachweis einer Zellschicht an der Oberfläche (Pfeil). **C)** M.P.-Färbung: Nahtstelle mit Nachweis von Muskulatur in Zugrichtung zur Naht (rot). **D)** M.P.-Färbung: Segelmitte ohne Nachweis von Kollagen und Zellen in der Segelmatrix.



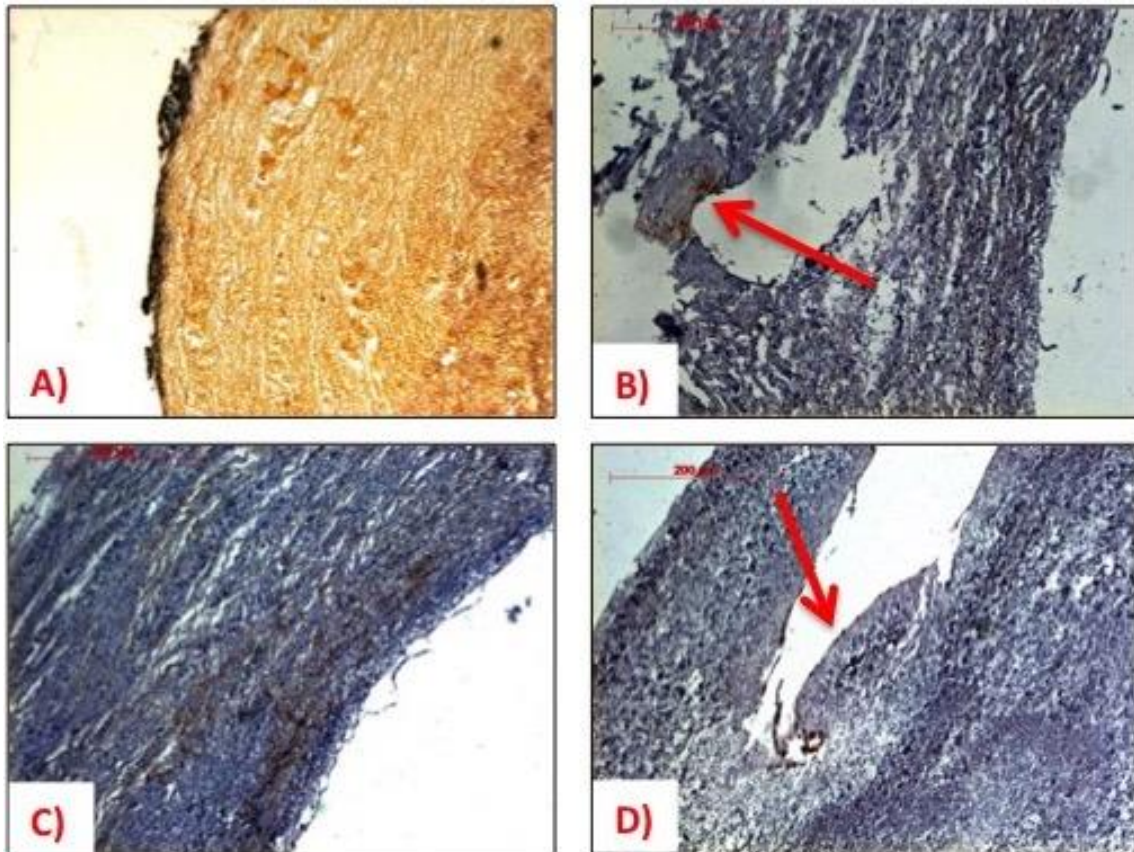
**Abbildung 10: Histologische Analyse von BN 3.** **A)** Von-Kossa-Färbung: Segelspitze und einer initialen, jedoch nicht manifesten Verkalkung der Besiedlungszellschicht. **B)** Aktin-Färbung: Nahtstelle mit Nachweis von Muskelzellen und Aktinfasern. **C)** Aktin-Färbung: Segelmitte mit schwacher Färbung von Aktinfasern innerhalb der Spongiosa des Segels. **D)** CD31-Färbung: Nachweis einer einschichtigen Endothelzellschicht (Pfeil) im Bereich am Übergang von Klappenwand zur Segelbasis.

**BN 4:** Durch die H.E.- und Aktin-Färbung wurden Muskelzellen im Bereich der Nahtstelle nachgewiesen (Abb. 11A + 12B). Des Weiteren zeigte sich eine Besiedlungszellschicht an der Segelbasis, -mitte und -spitze (Abb. 11B-D). Es wurden keine Zellen in der Segelmatrix nachgewiesen. Größtenteils zeigte sich eine regelmäßige, intakte Gewebestruktur, gelegentlich waren Auflockerungen zu erkennen. Muskelzellen und Endothelzellen in der Zellschicht wurden vereinzelt an der Segelbasis nachgewiesen (Aktin, CD31: Grad I; Abb. 12D). Der Aktin-faser-Nachweis war am Übergang zur Segelbasis in der Spongiosa schwach positiv (Abb. 12C). Verkalkungen waren nicht zu sehen (Von-Kossa: Grad 0), die Besiedlungszellschicht an der Segelbasis wies eine gräuliche Färbung auf (Abb. 12A).



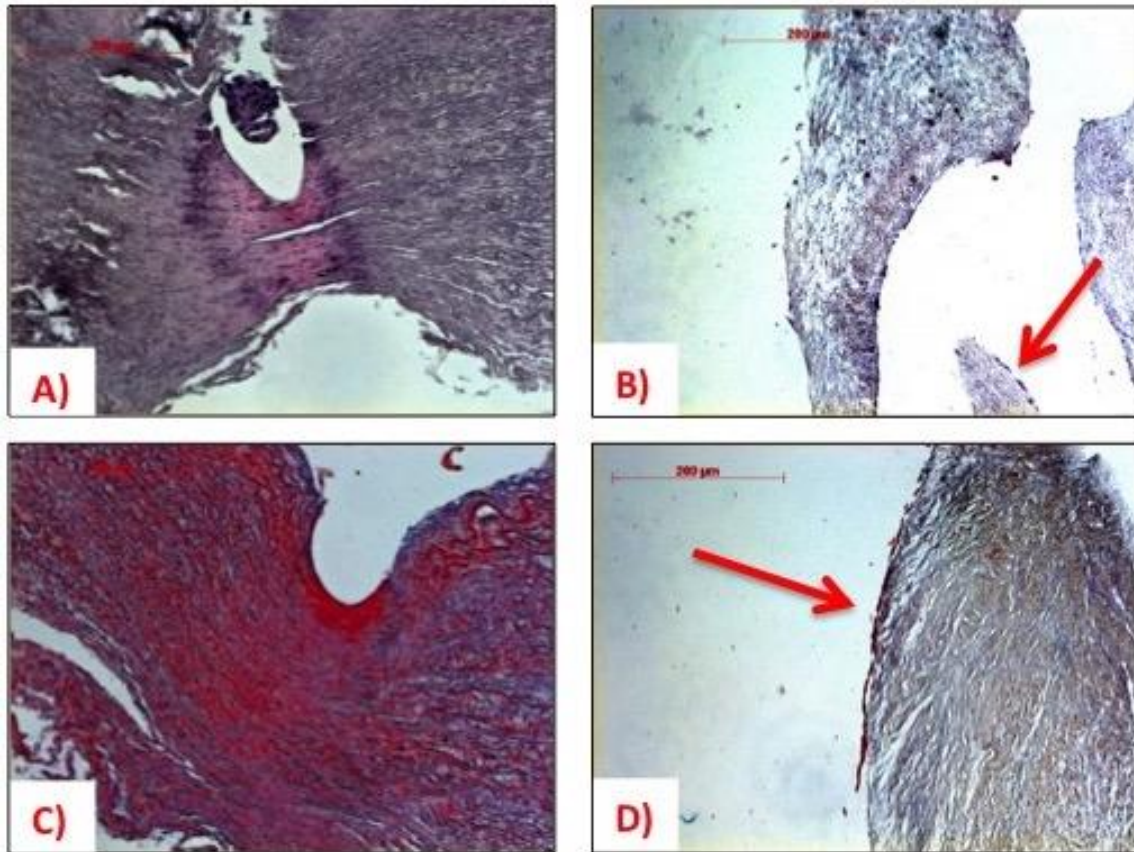


**Abbildung 11: Histologische Analyse von BN 4.** **A)** H.E.-Färbung: Nahtstelle mit Nachweis von Zellkernen (blau) in Zugrichtung zur Naht. **B)** H.E.-Färbung: Segelmitte mit einer oberflächlichen, einschichtigen Zellschicht (Pfeil). **C)** M.P.-Färbung: Übergang zur Segelbasis mit Nachweis einer einschichtigen fortlaufenden Besiedlungszellschicht. Im Bereich der Klappenwand zeigten sich Muskulatur (rot) und elastische Fasern (schwarz). **D)** M.P.-Färbung: Segelspitze mit Nachweis von Muskelzellen (rot) an der Oberfläche (Pfeil).



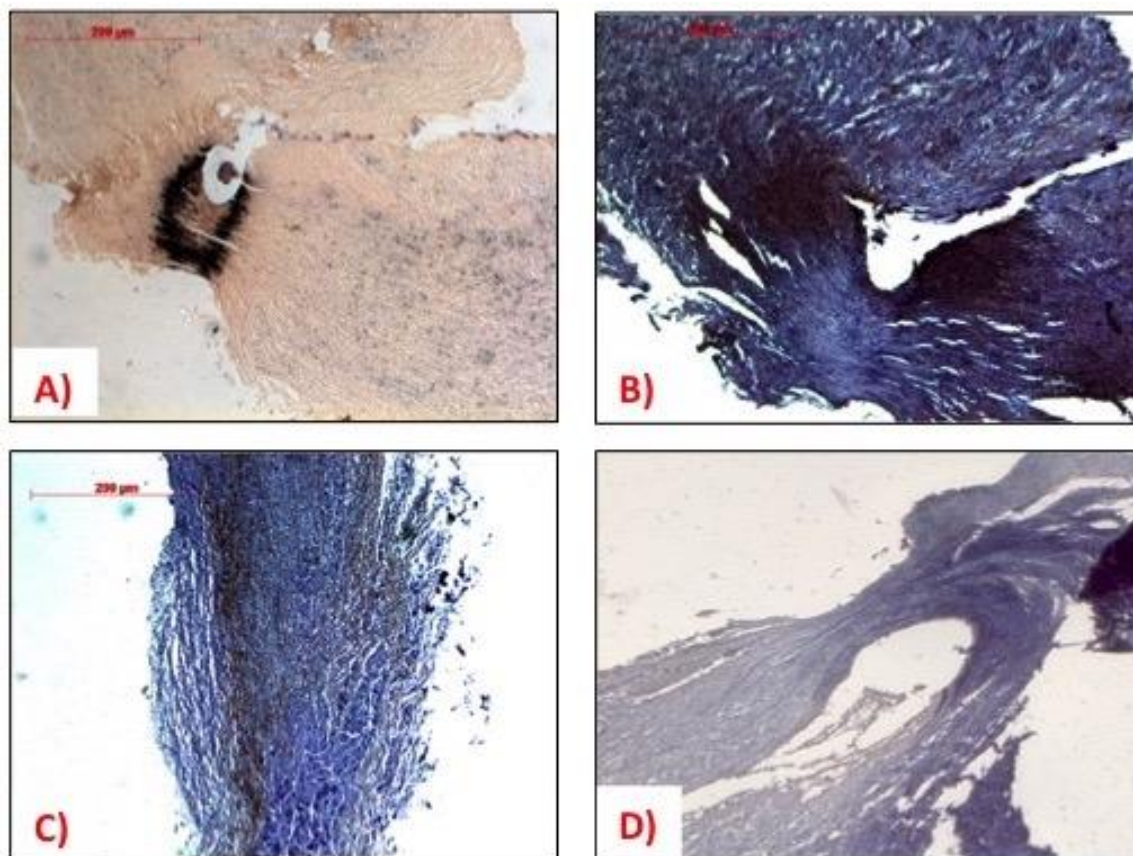
**Abbildung 12: Histologische Analyse von BN 4.** **A)** 10-fache Vergrößerung einer Von-Kossa-Färbung: Segelbasis mit grünen Verfärbungen der Besiedlungszellschicht an der Segelbasis. **B)** Aktinfärbung: Nahtstelle mit einzelnen Muskelfasern in Zugrichtung zur Naht (Pfeil). **C)** Aktinfärbung: Übergang der Segelbasis. Hier zeigen sich überwiegend schwach gefärbte Aktinfasern in der Spongiosa. **D)** CD31-Färbung: Segelbasis mit einschichtigen zusammenhängenden Endothelzellen (Pfeil).

**BN 5:** Durch die H.E.- und M.P.-Färbung wurden Muskelzellen und Muskelfasern im Bereich der Nahtstelle nachgewiesen (Abb. 13A+C). Eine Zellschicht war vereinzelt in der Segelmitte und -spitze nachweisbar (Abb. 13B+D). Die Gewebestruktur zeigte sich regulär konfiguriert. Die Nahtstelle wies Verkalkungen auf (Von-Kossa: Grad I; Abb. 14A). Es zeigten sich Aktinfasern im Bereich der Nahtstellen und in der Spongiosa der Segelbasis (Abb. 14B+C). Die Besiedlungszellschicht wies vereinzelt Muskelzellen auf (Aktin: Grad I). Die CD31-Färbung erbrachte keinen Nachweis von Endothelzellen (CD31: Grad 0; Abb. 14D).



**Abbildung 13: Histologische Analyse von BN 5.** **A)** H.E.-Färbung: Nahtstelle mit Nachweis von Muskelzellkernen (blau) und muskulärem Gewebe (rot). **B)** H.E.-Färbung: Segelmitte mit Nachweis einer Besiedlungszellschicht (Pfeil) und diskret aufgelockerter Segelstruktur. **C)** M.P.-Färbung: Nachweis von Muskulatur (rot) in Zugrichtung zur Naht, die sich im Bereich der Klappenwand ausbreitet. **D)** M.P.-Färbung: Segelmitte mit Nachweis eines Monolayers (Pfeil) der Besiedlungszellschicht mit Muskelzellen (rot).





**Abbildung 14: Histologische Analyse von BN 5. A)** Von-Kossa-Färbung: Nahtstelle mit Verkalkung in direkter Umgebung. **B)** Aktin-Färbung: Nahtstelle mit Aktinfasern. **C)** Aktin-Färbung: Segelbasis mit schwacher Färbung von Aktin-Fasern innerhalb der Spongiosa. Kein Nachweis einer Besiedlungszellschicht. **D)** CD31-Färbung: Nahtstelle und Klappenwand ohne Nachweis einer Endothelzellschicht.

### 3.1.2. Zusammenfassung der Ergebnisse von BN 1-5

**H.E.-Färbungen:** Die Besiedlungszellschichten waren im Bereich der Segelbasis schwach ausgeprägt. Die Segelmitten und -spitzen wiesen vereinzelt auf das Vorhandensein einer Zellschicht hin, die Färbungen lieferten jedoch keinen Hinweis, dass eine zusammenhängende Zellschicht existiert. In BN 1 und BN 5 zeigten sich Auflockerungen des Klappengewebes. Zellkerne im Bereich der Nahtstellen konnten durch die H.E.-Färbung dargestellt werden.

**M.P.-Färbungen:** Der Nachweis von Besiedlungszellschichten zeigte sich vorrangig an der Segelbasis. Hier stellte sich eine mucinhaltige retikuläre Grundsubstanz mit Muskelzellen dar. Eine mehrschichtige Besiedlungszellschicht war nur in BN 2 zu sehen. Die restlichen tissue-engineerten Klappen waren vorrangig von einer einschichtigen und flachen Zellschicht bedeckt. In der Spongiosa der Schnitte zeigten sich keine Zellen.

Die rötlichen bis dunkelroten Färbungen im Bereich der Nahtstellen in BN 1, BN 3 und BN 5 wiesen auf Muskelzellen hin. Fibrin war nicht zu erkennen. Das Auftreten von Auflockerungen des Gewebes deckte sich mit den Ergebnissen der H.E.-Färbung.

**Von-Kossa-Färbungen:** Verkalkungen traten nur in BN 5 im Bereich der Naht auf. In Schnitten von BN 4 zeigten sich initiale Verkalkungen der Besiedlungszellschicht. Drei Klappen wiesen keine Verkalkungen auf.

**CD31-Färbungen:** In Schnitten von BN 1 und BN 4 zeigten sich vereinzelte positive Färbungen von CD31<sup>+</sup>-Zellen an der Segelbasis. Segelmitte und Segelspitze waren in allen Schnitten frei von positiven Färbungen. Die Nahtstellen stellten sich unauffällig dar.

**Aktin-Färbungen:** In vier der fünf Klappen waren positive Färbungen an den Nahtstellen zu erkennen, an denen Zellen in Zugrichtung der Naht in den vorherigen Übersichtsfärbungen nachgewiesen werden konnten. An der Segelbasis zeigten sich oberflächliche positive Färbungen der Besiedlungszellschichten in BN 1 und BN 2. Eine Infiltration Aktin-positiver Zellen wurde nicht beobachtet. Die restlichen Klappen wiesen keine positiven Färbungen einer Besiedlungszellschicht auf.

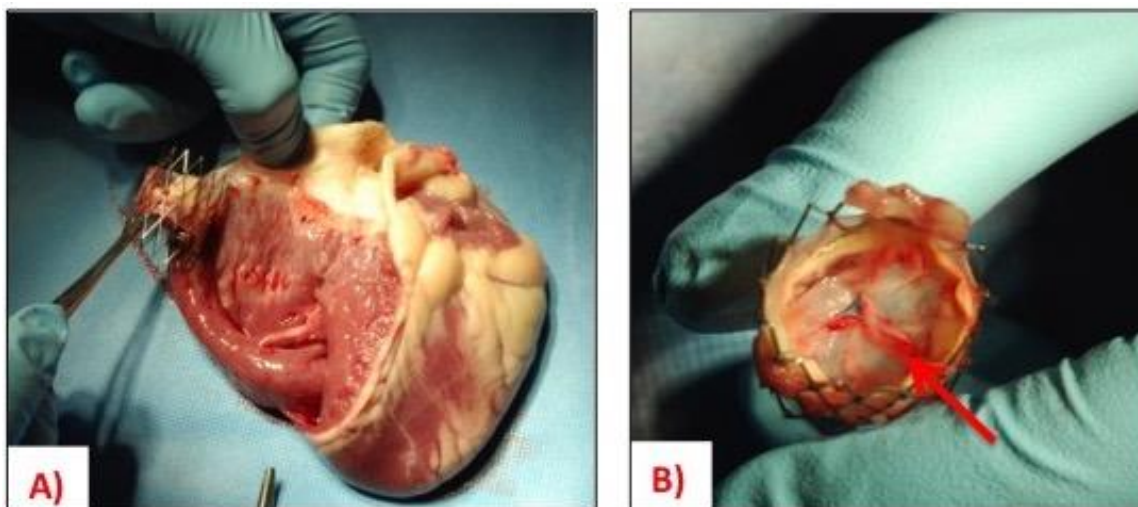


## 3.2. Ergebnisse: Besiedelte, implantierte, nach 4 Wochen explantierte Klappen (BI)

### 3.2.1. Klinik und makroskopische Auswertung

**BI 1:** Während der Platzierung des Stents trat eine Tachykardie auf, der restliche Verlauf der Operation gestaltete sich als komplikationslos und das Tier konnte anschließend in den Stall verbracht werden.

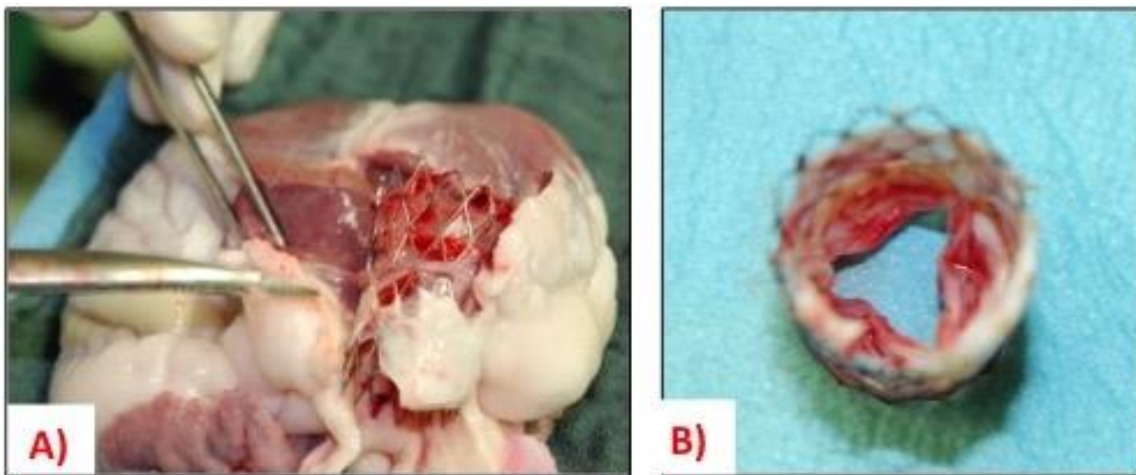
Bei der *post mortem*-Analyse wurde festgestellt, dass sich der Stent unterhalb der nativen Pulmonalklappe entfaltet hat. An den Kontaktstellen des Stents im RVOT waren leichte Entzündungsreaktionen zu erkennen (Abb. 15A). Der Stent reichte bis in den rechten Ventrikel hinein. Die Segel erschienen leicht verdickt, konnten sich aber komplett schließen. An den Segelrändern und -spitzen zweier Taschen waren Rötungen zu sehen (Abb. 15B). Es bestanden keine Anzeichen einer Endokarditis.



**Abbildung 15: Makroskopische Beurteilung von BI 1.** A) Hier stellen sich leichte Entzündungen an den Kontaktstellen des Stents mit dem RVOT dar. B) Die Lanulae der Taschenklappen sind gerötet (Pfeil) und schließen vollständig.

**BI 2:** Nach der Positionierung des Stents traten Arrhythmien auf, ansonsten verlief die Operation komplikationslos.

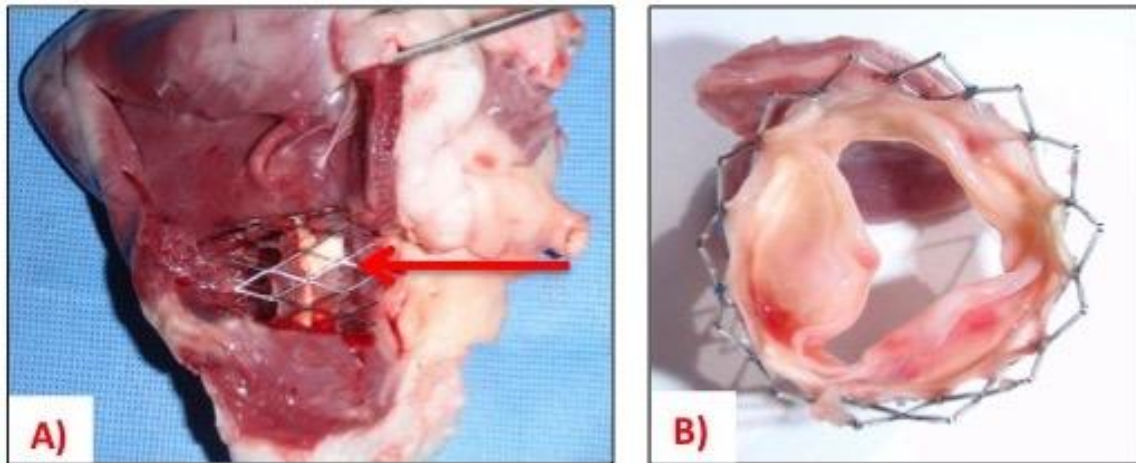
Der Stent lag in einer optimalen Position, die native Klappe befand sich auf gleicher Höhe wie die tissue-engineerte Klappe. Die Kontaktstellen des RVOT mit dem Stent stellten sich unauffällig dar (Abb. 16A). Im Bereich der Nahtstellen an der Außenseite des Stents fanden sich leicht-rötliche Entzündungen. Die Segel waren retrahiert und verdickt, stellenweise an den Kommissuren und in der Segelmitte gerötet (Abb. 16B). Es fanden sich keine makroskopischen Zeichen einer Endokarditis.



**Abbildung 16: Makroskopische Beurteilung von BI 2.** **A)** Unauffällige Darstellung des RVOT mit einliegendem Stent. **B)** Es zeigen sich leicht retrahierte Segel und eine leichte Rötung der Taschenklappen.

**BI 3:** Im Rahmen einer Kontrollangiographie wurde festgestellt, dass sich der Stent subvalvulär entfaltet hat und die native Klappe durch das Metallgerüst nicht an die Gefäßwand gedrückt wurde. Somit waren zwei Klappen in Reihe entfaltet. Der Blutdruck im rechten Ventrikel stieg von 20/3 mmHg auf 24/7 mmHg.

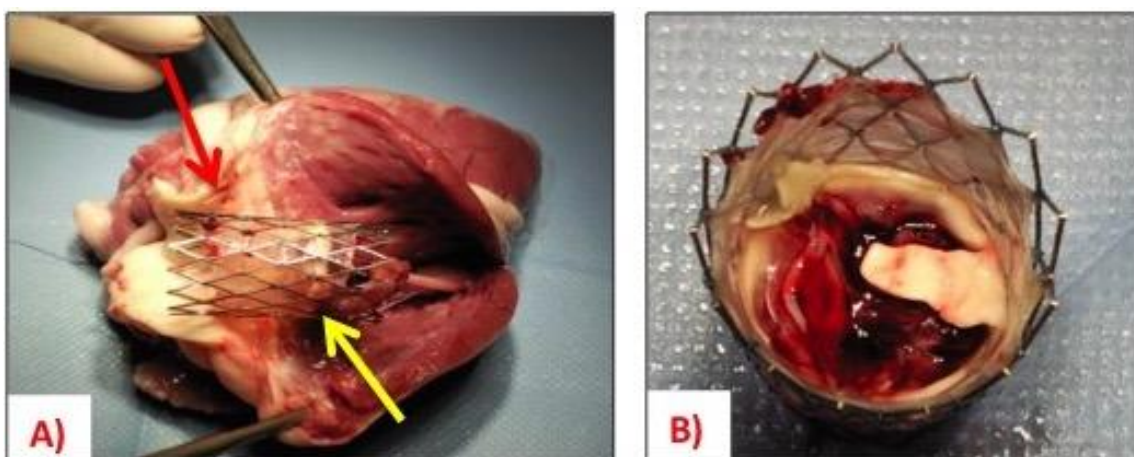
In der *post mortem*-Analyse erkannte man deutlich, dass die ursprüngliche Klappe oberhalb des Metallgerüsts liegt und der Stent in den rechten Ventrikel hineinragte (Abb. 17A). Zeichen einer Endokarditis oder einer Entzündung an den Kontaktstellen des Stents mit dem RVOT waren nicht zu sehen. Die Segel stellten sich nicht gerötet dar, jedoch verdickt und retrahiert (Abb. 17B).



**Abbildung 17: Makroskopische Beurteilung von BI 3.** A) Die native Pulmonalklappe liegt oberhalb des Stents (Pfeil). B) Die Taschenklappen waren leicht verdickt, jedoch nicht gerötet. Zwei Klappen zeigten sich retrahiert.

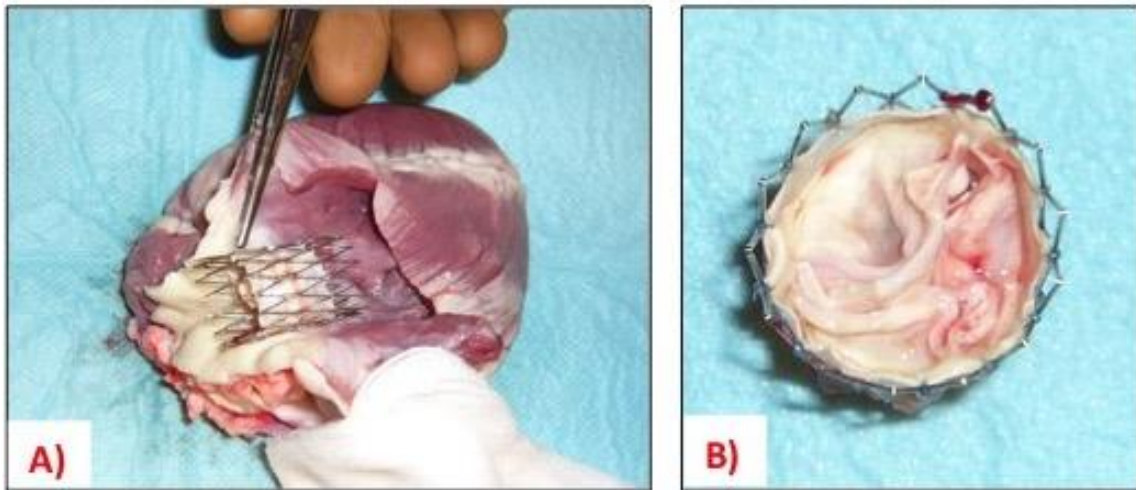
**BI 4:** Während der Implantation kam es zu einem Blutdruckabfall (62/39 mmHg), der medikamentös erfolgreich therapiert wurde. In der Kontrollangiographie konnte eine gute Positionierung des Stents dargestellt werden. Das Schaf verstarb während einer Kontrolluntersuchung im CT aufgrund insuffizienter Beatmungsverhältnisse.

In der *post mortem*-Analyse zeigt sich, dass die tissue-engineerte Klappe leicht unterhalb der nativen Klappe liegt (Abb. 18A). Es bestanden keine Zeichen einer Endokarditis, die Kontaktstellen des Stents im RVOT stellen sich unauffällig dar. Die Segel sind verdickt und gerötet (Abb. 18B).



**Abbildung 18: Makroskopische Beurteilung von BI 4.** A) Die implantierte Klappe (gelber Pfeil) lag unterhalb der alten Klappe (roter Pfeil). B) Die Taschenklappen stellten sich gerötet und verdickt dar.

**BI 5:** Die Operation verlief komplikationslos, das Schaf konnte anschließend in den Stall verbracht werden. Die implantierte Herzklappe lag auf gleicher Höhe mit der nativen Klappe. An den Kontaktstellen des Stents mit dem RVOT waren keine entzündlichen Veränderungen zu erkennen (Abb. 19A). Die Segel sind verdickt, allerdings nicht gerötet und nicht retrahiert (Abb. 19B). Es bestanden keine Anzeichen einer Endokarditis.

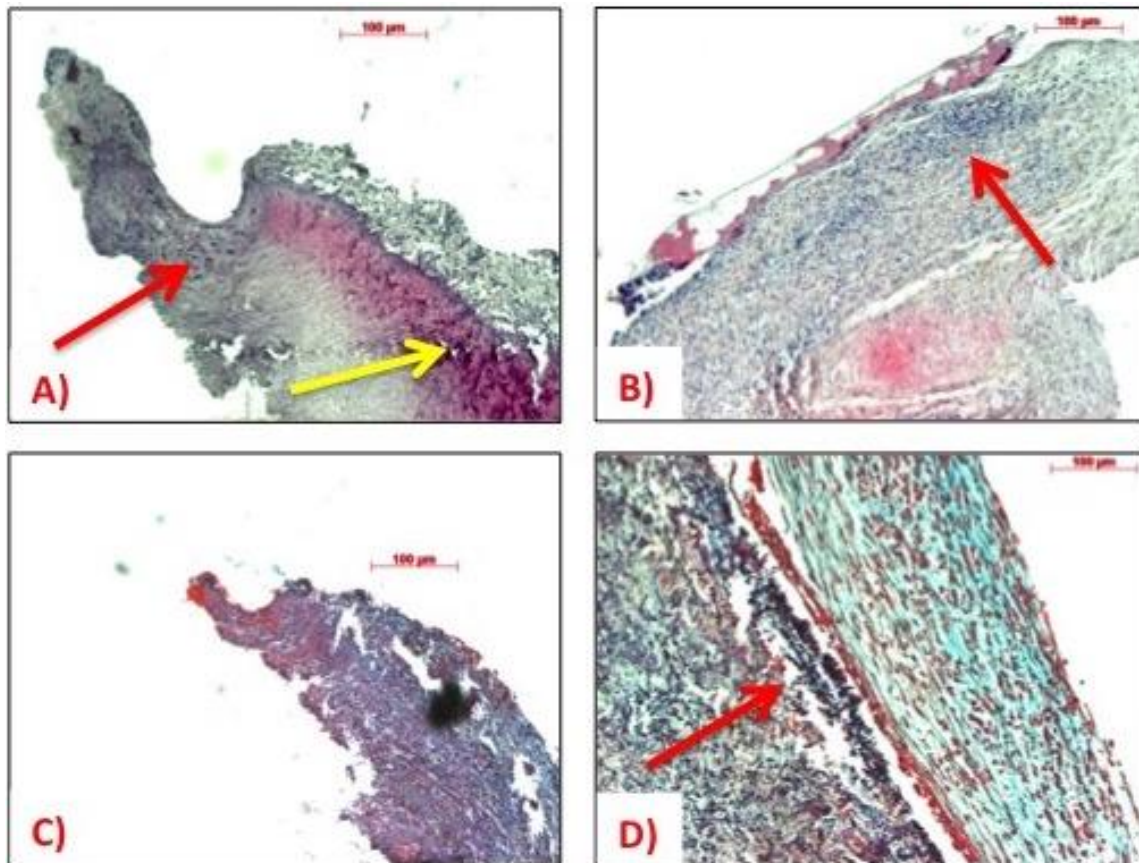


**Abbildung 19: Makroskopische Beurteilung von BI 5. A)** Es zeigte sich eine optimale Stentposition, kein Nachweis von Entzündungszeichen an den Kontaktstellen des Stents mit dem RVOT. **B)** Die Taschenklappen schlossen vollständig und waren leicht verdickt jedoch nicht gerötet.

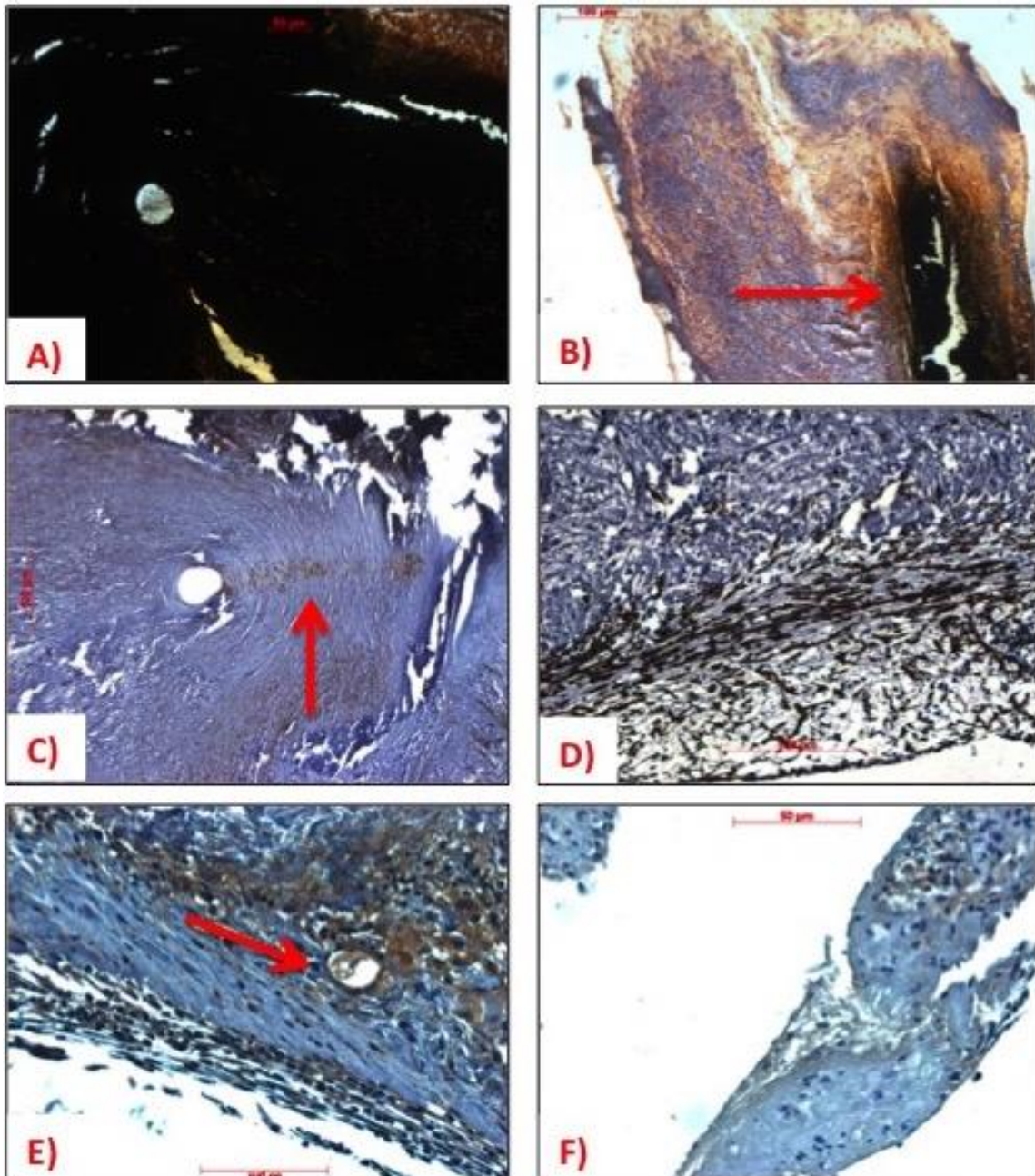
### 3.2.2. Mikroskopische Auswertung

**BI 1:** In den gefärbten Schnitten der H.E.- und M.P.-Färbung zeigten sich Muskelzellen in Zugrichtung zur Naht (Abb. 20A+C) sowie Auflockerungen und Fibrinansammlungen, die sich im Bereich der Segelbasis ausbreiteten. Der Übergangsbereich zwischen Besiedlungszellschicht und Segelmatrix wies sowohl im Bereich der Segelbasis als auch der Segelmitte Destruktionen und Fibrinansammlungen auf, die von teilweise massiven Zellansammlungen begleitet wurden (Abb. 20A-D). Die Besiedlungszellschicht setzte sich aus einem Zellverband von Muskelzellen und einer Grundsubstanz aus Mucin und Proteoglykanen zusammen. An ihrer Oberfläche konnte man eine nicht durchgängig geschlossene Zellschicht erkennen. Die Ausprägung der Besiedlungszellschicht nahm ausgehend von der Segelbasis zur Segelmitte kontinuierlich ab, an der Segelspitze war keine Besiedlungszellschicht nachzuweisen. Des Weiteren zeigte sich die Besiedlungszellschicht vorrangig an der Ventrikularis. Es wurden ausgeprägte Verkalkungen, vor allem in räumlicher Nähe zur Nahtstelle, in allen Schnitten nachgewiesen (Von-Kossa: Grad III; Abb. 21A+B). Zudem wiesen gräuliche Verfärbungen der Zellkonglomerate innerhalb des Segels auf eine beginnende Verkalkung hin. Die Aktin-Färbung zeigte übereinstimmend zu den Übersichtsfärbungen Muskelzellen und Aktinfasern im Bereich der Nahtstelle auf (Abb. 21C). Außerdem wurde ein Zellverband von Muskelzellen und Aktinfasern innerhalb der Besiedlungszellschicht mit vereinzelt Infiltrationen der Muskelzellen in die Matrix nachgewiesen (Aktin: Grad III; Abb. 21D). CD31-positive Zellen der Oberfläche der Besiedlungszellschicht konnten im Bereich der Segelbasis, -mitte und -spitze nachgewiesen werden (Abb. 21F), allerdings nicht deckend über alle Segelbereiche (CD31: Grad II). Des Weiteren zeigten sich CD31-positive Zellen unterhalb der Besiedlungszellschicht am Übergang zur Segelmatrix mit Auflockerungen der Matrix. Es zeigten sich Blutgefäße mit auskleidenden Endothelzellen innerhalb der Besiedlungszellschicht an der Segelbasis (Abb. 21E).





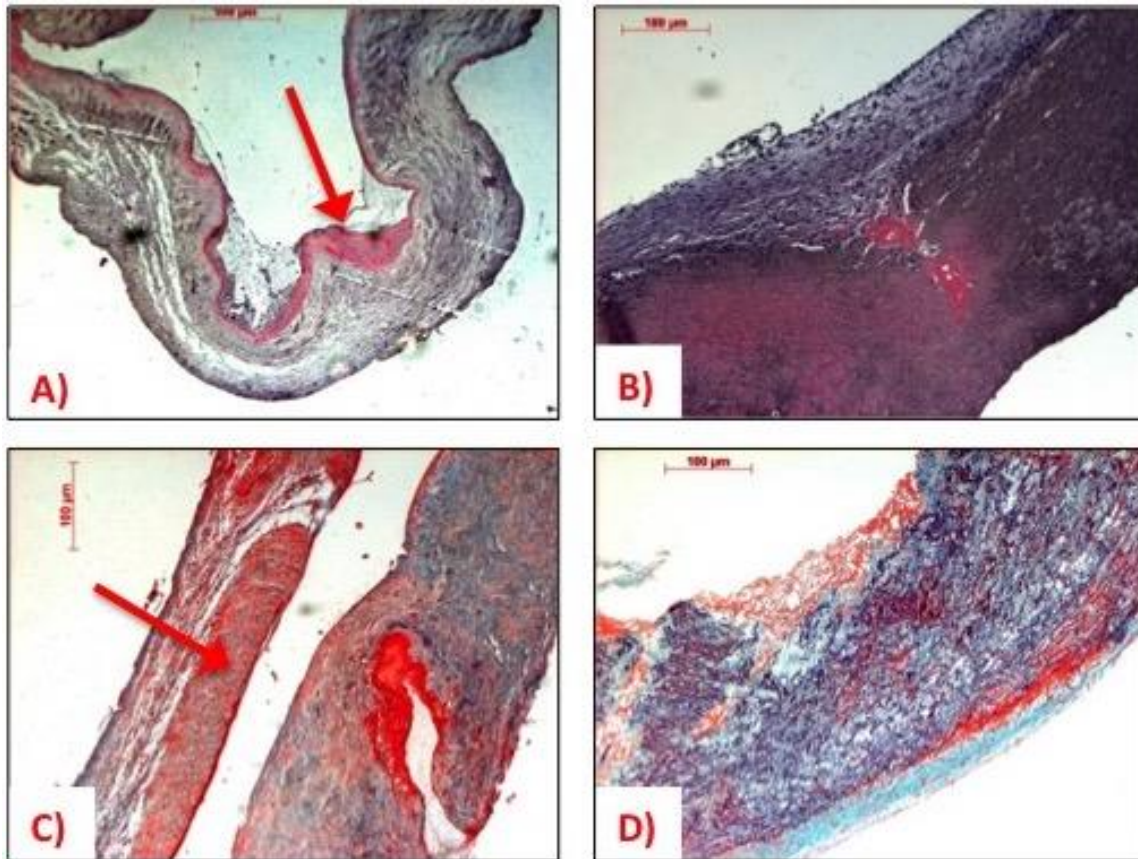
**Abbildung 20: Histologische Analyse von BI 1.** **A)** H.E.-Färbung: Nahtstelle an der Klappenwand mit Nachweis von Zellkernen (blau) in Zugrichtung der Naht (roter Pfeil). Fibrinansammlung und Destruktionen (gelber Pfeil) unter der Besiedlungszellschicht. **B)** H.E.-Färbung: Segelmitte mit Zellansammlung unterhalb der Besiedlungszellschicht (Pfeil). **C)** M.P.-Färbung: Nahtstelle mit Nachweis von Muskelzellen (rot) und Auflockerung der Gewebestruktur. **D)** M.P.-Färbung: Segelbasis mit aufliegender Besiedlungszellschicht an der Ventrikularis, in der Muskelzellen (rot), eine deckende oberflächliche Zellschicht und Auflockerungen unterhalb der Zellschicht (Pfeil) zu erkennen sind.



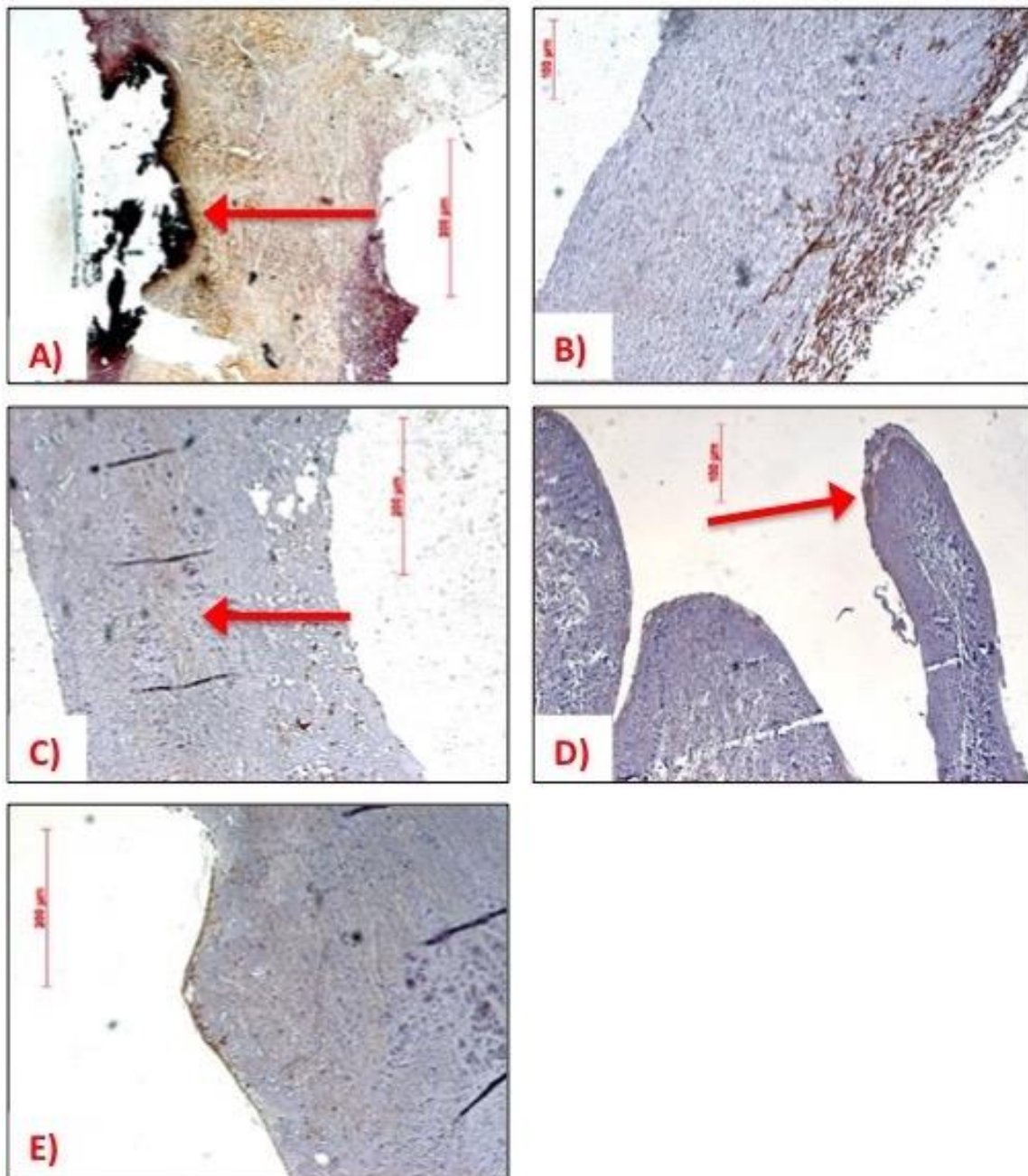
**Abbildung 21: Histologische Analyse von BI 1.** **A)** Von-Kossa-Färbung: Hochgradige Verkalkungen der Nahtstelle. **B)** Von-Kossa-Färbung: Segelmitte mit Nachweis einer Verkalkung innerhalb der Spongiosa (Pfeil) sowie Zellansammlungen unterhalb der Besiedlungszellschicht und in der Segelmatrix. **C)** Aktin-Färbung: Nahtstelle mit Muskelzellen in Zugrichtung zur Naht (Pfeil) sowie leichter Färbung von Aktinfasern im Bereich der Klappenwand. **D)** Aktin-Färbung: Segelbasis mit Nachweis eines muskulären Zellverbandes an der Ventrikularis innerhalb der Besiedlungszellschicht sowie Infiltrationen der Muskelzellen in die Segelmatrix. **E)** CD31-Färbung: Segelbasis mit Nachweis von CD31 positiven Zellen in der aufliegenden Besiedlungszellschicht sowie unterhalb der Zellschicht am Übergang zur Matrix. Es zeigt sich ein Blutgefäß mit Endothelzellen (Pfeil). **F)** CD31-Färbung: Segelspitze mit Nachweis von Endothelzellen an der Oberfläche.

**BI 2:** In den Schnitten der Übersichtsfärbungen zeigten sich Muskelzellen im Bereich der Nahtstellen. Die Besiedlungszellschicht war vorrangig an der Segelbasis als deckender oberflächlicher Zellverband ausgebildet (Abb. 22B+D) und nahm zur Segelmitte hin kontinuierlich an Höhe ab. Die Segelspitzen waren frei von einer Zellschicht. Es konnten Zellkonglomerate mit Fibrinansammlungen am Übergang von Zellschicht zur Segelmatrix nachgewiesen werden, die zu einer Zerstörung der ursprünglichen Segelstruktur führten (Abb. 22B+D). Bei Betrachtung des gesamten Segels fiel auf, dass vor allem die Einkerbungen in der Fibrosa an Segelbasis und Segelspitze und die Nahtstellen Fibrinansammlungen aufzeigten (Abb. 22A). Eine geschlossene Zellschicht an der Oberfläche zeigte sich nur im Bereich der Segelbasis, hier vorrangig an der Ventrikularis. Vereinzelt waren Verkalkungen mit Verlust der strukturellen Integrität innerhalb der Besiedlungszellschicht und der angrenzenden Segelmatrix zu erkennen (Von-Kossa: Grad II; Abb. 23A). In die Segelmatrix einwachsende Muskelzellen und Aktinfasern waren an der Segelbasis bei aufliegender Besiedlungszellschicht zu erkennen (Aktin: Grad III; Abb. 23B). Die Segelmitte und –spitze zeigten keine Muskelzellen und keine Zellschicht. Vereinzelt konnte eine schwache Färbung von Aktinfasern innerhalb der Spongiosa am Übergang von Klappenwand zur Segelbasis festgestellt werden (Abb. 23C). Eine deckende Endothelzellschicht war an der Segelbasis regelmäßig zu finden (CD31: Grad III). In der Segelmitte und –spitze waren vereinzelt Endothelzellen nachzuweisen, jedoch keine deckende Zellschicht (Abb. 23D+E). Des Weiteren wurden CD31-positive Zellen im Bereich der Nahtstellen und in Zellansammlungen am Übergang von Besiedlungszellschicht zur Klappenmatrix gefunden.





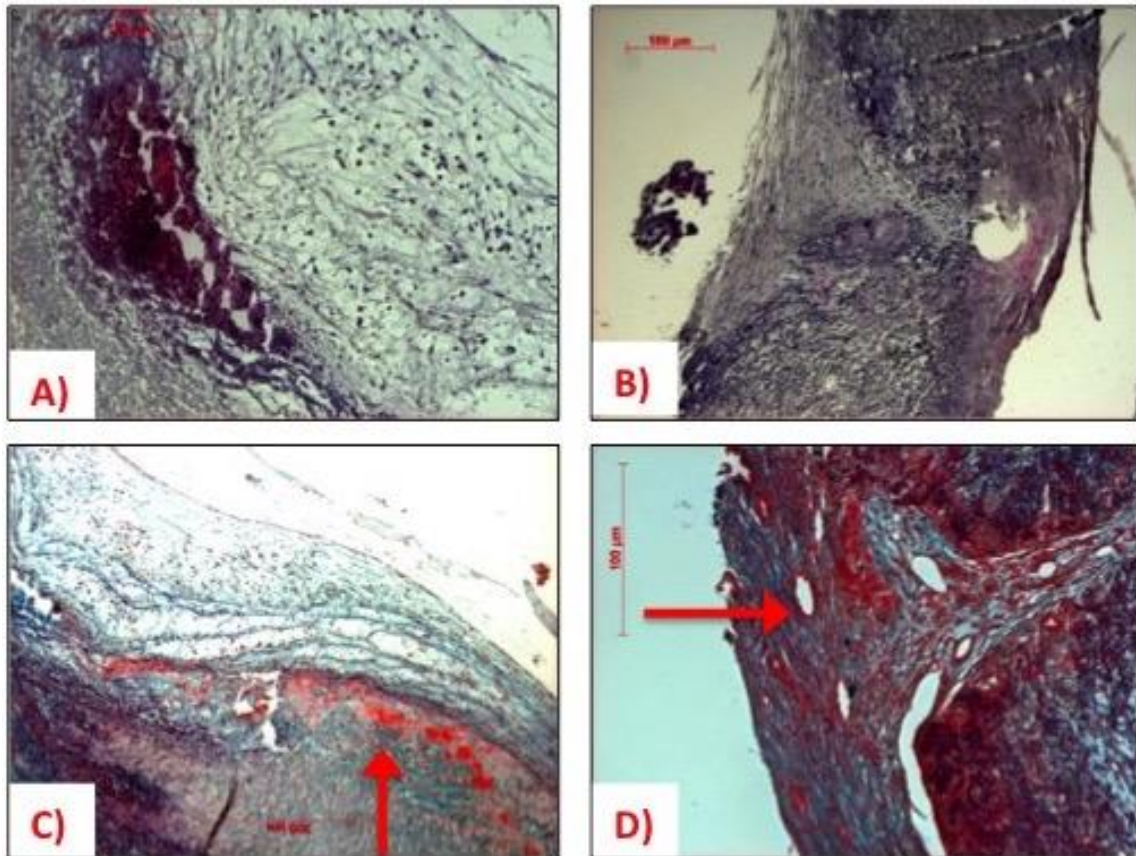
**Abbildung 22: Histologische Analyse von BI 2.** **A)** H.E.-Färbung: Segelmitte, Nachweis von Fibrin unterhalb der Besiedlungszellschicht in der Fibrosa (Pfeil). **B)** H.E.-Färbung: Deckende, mehrschichtige Besiedlungszellschicht an der Segelbasis der Ventrikularis mit in die Segelmatrix infiltrierenden Zellkernen und Nachweis einer Fibrinansammlung, die in die Klappenmatrix reicht. **C)** M.P.-Färbung: Die Ventrikularis und Fibrosa in der Segelmitte sind von Fibrin (intensiv rot) durchsetzt. Einkerbung der Fibrosa mit starker Fibrinansammlung. **D)** M.P.-Färbung: Mehrschichtige Besiedlungszellschicht der Ventrikularis an der Segelbasis anliegend mit Muskelzellen und einer deckenden oberflächlichen Zellschicht sowie Fibrinansammlungen am Übergang von Zellschicht zur Segelmatrix.



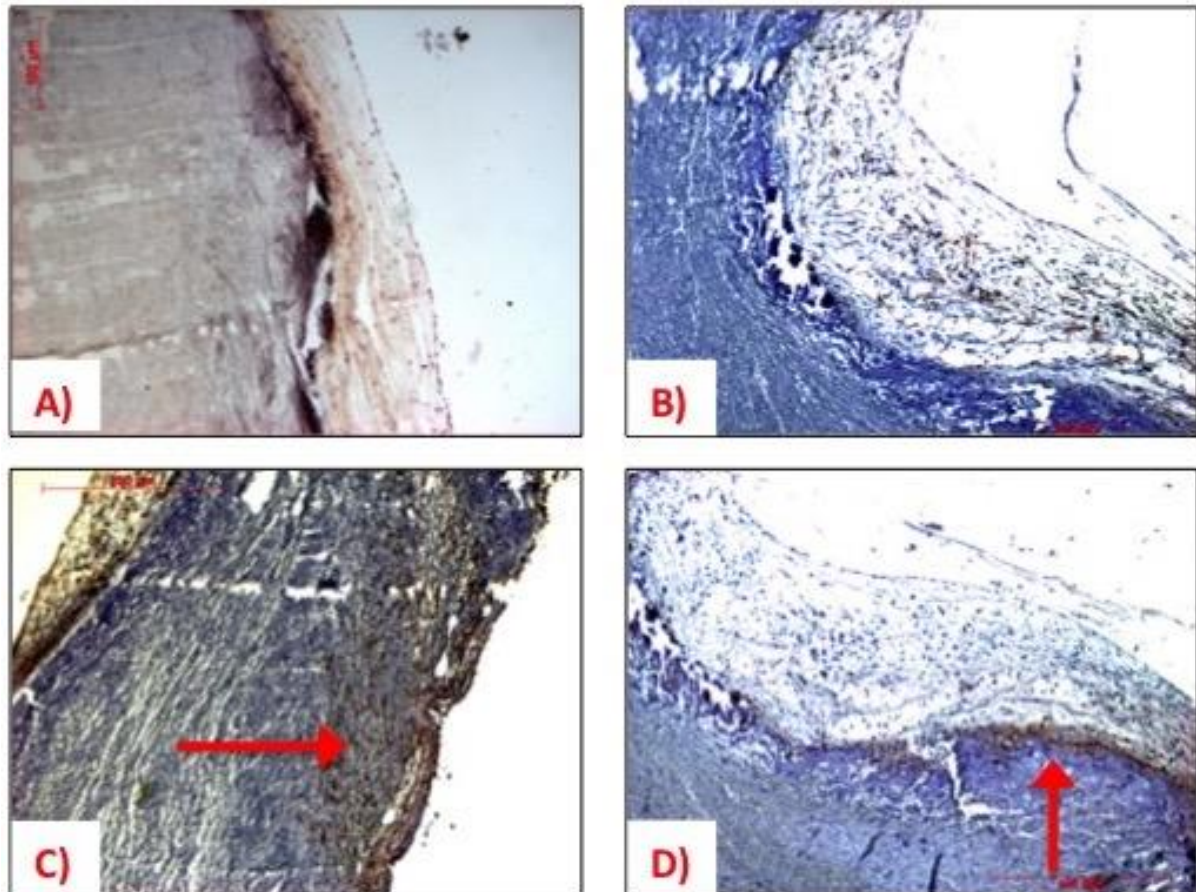
**Abbildung 23: Histologische Analyse von BI 2.** **A)** Von-Kossa-Färbung: Segelmitte mit Nachweis einer Verkalkung (Pfeil) der Besiedlungszellschicht und der Segelmatrix, die zur Destruktion des Gewebes führte. **B)** Aktin-Färbung: Segelbasis der Ventrikularis mit Nachweis von Muskelzellen, die die Segelmatrix infiltrieren. **C)** Aktin-Färbung: Schwache Färbung von Aktinfasern (Pfeil) innerhalb der Spongiosa der Segelbasis. **D)** CD31-Färbung: Segelspitze mit Nachweis von Endothelzellen an der Segeloberfläche. **E)** CD31-Färbung: Segelbasis mit deckender Endothelzellschicht.

**BI 3:** Die Schnitte der Übersichtsfärbungen zeigten Auflockerungen und Destruktionen, die vor allem unter der Besiedlungszellschicht und den Nahtstellen auftreten. Durch die M.P.-Färbung konnte das Vorhandensein von Fibrin und Zellansammlungen in diesen Bereichen nachgewiesen werden (Abb. 24A-C). Innerhalb der Besiedlungszellschicht der Segelbasis, welche vor allem an der Ventrikularis angelegt war, konnten Blutgefäße nachgewiesen werden (Abb. 24D). Die Nahtstellen wiesen konzentrisch angeordnete Muskelzellen auf (Abb. 24B). Die Besiedlungszellschicht war an der Segelbasis am stärksten ausgeprägt, die Segelspitze wies keine Zellschicht auf (Abb. 24A-C + 25B-D). Verkalkungen konnten unter der Besiedlungszellschicht und in Nähe der Nahtstellen nachgewiesen werden (Abb. 25A). An den Segelspitzen konnten vereinzelt Verkalkungen festgestellt werden (Von-Kossa: Grad III). Bei aufliegender Besiedlungszellschicht wurden Muskelzellen innerhalb der Segelmatrix nachgewiesen (Aktin: Grad III; Abb. 25C). Die Zellschicht war an der Segelbasis oberflächlich deckend und es konnte eine Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen unterhalb der Muskelzellen nachgewiesen werden (Abb. 25C). Vereinzelt Nachweise von oberflächlichen Endothelzellen zeigten sich in den gefärbten Schnitten der CD31-Färbung (CD31: Grad II). Unterhalb der Besiedlungszellschicht fanden sich zahlreiche Färbungen von CD31-positiven Zellen (Abb. 25D). In den Schnitten der M.P.-Färbung zeigte sich in diesen Bereichen Fibrin. Die Nahtstellen zeigten in BI 3 keine CD31<sup>+</sup>-Zellen auf.





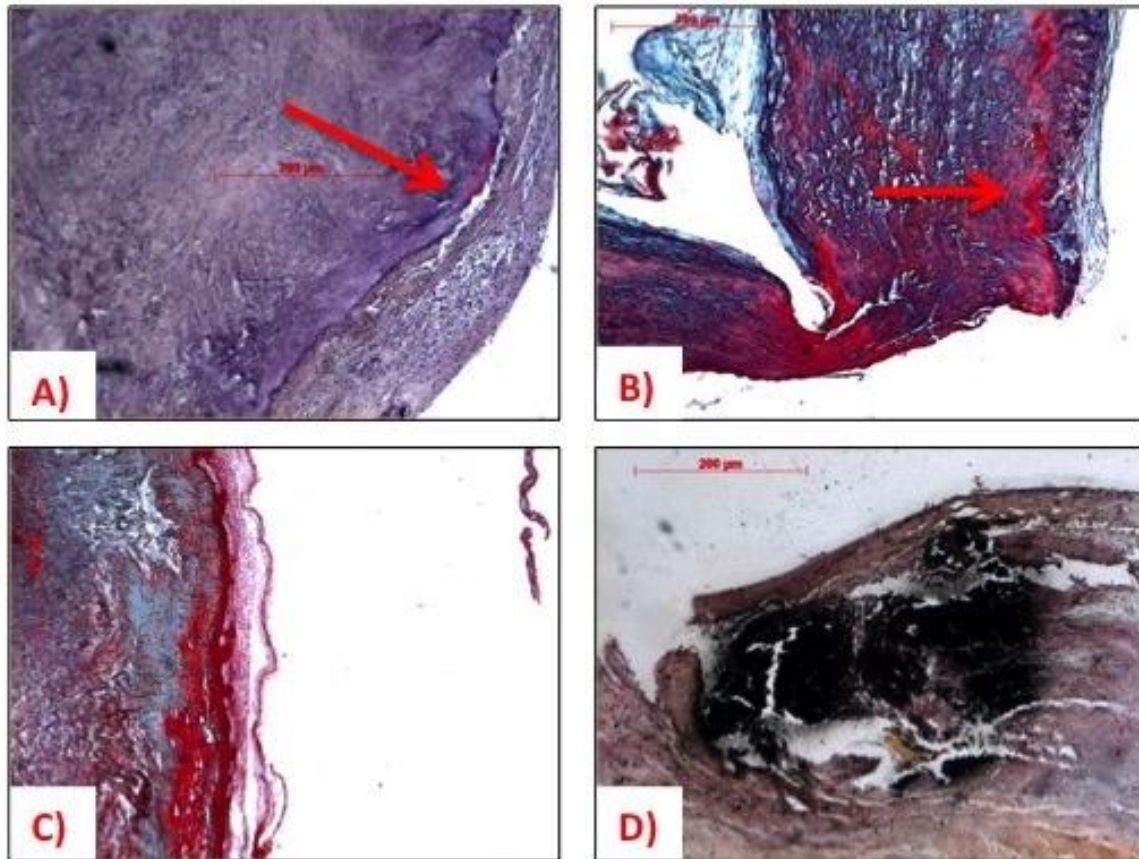
**Abbildung 24: Histologische Analyse von BI 3.** **A)** H.E.-Färbung: Segelbasis der Ventrikularis mit Besiedlungszellschicht und Destruktion an der Übergangszone von Besiedlungszellschicht zur Segelmatrix. **B)** H.E.-Färbung: Nahtstelle in der Klappenwand mit Muskelzellen in Zugrichtung zur Naht und einer Zelinvasion, die zur Destruktion der Struktur der Klappenwand führt, ausgehend von der luminalen Klappenseite. **C)** M.P.-Färbung: Segelbasis der Ventrikularis mit aufliegender Besiedlungszellschicht bestehend aus Muskelzellen und einer deckenden Zellschicht an der Oberfläche. Es zeigen sich Fibrinansammlungen (Pfeil) und Auflockerungen der Segelmatrix unterhalb der Besiedlungszellschicht. **D)** M.P.-Färbung: Segelbasis der Ventrikularis mit Besiedlungszellschicht und Nachweis von Blutgefäßen innerhalb der Besiedlungszellschicht (Pfeil).



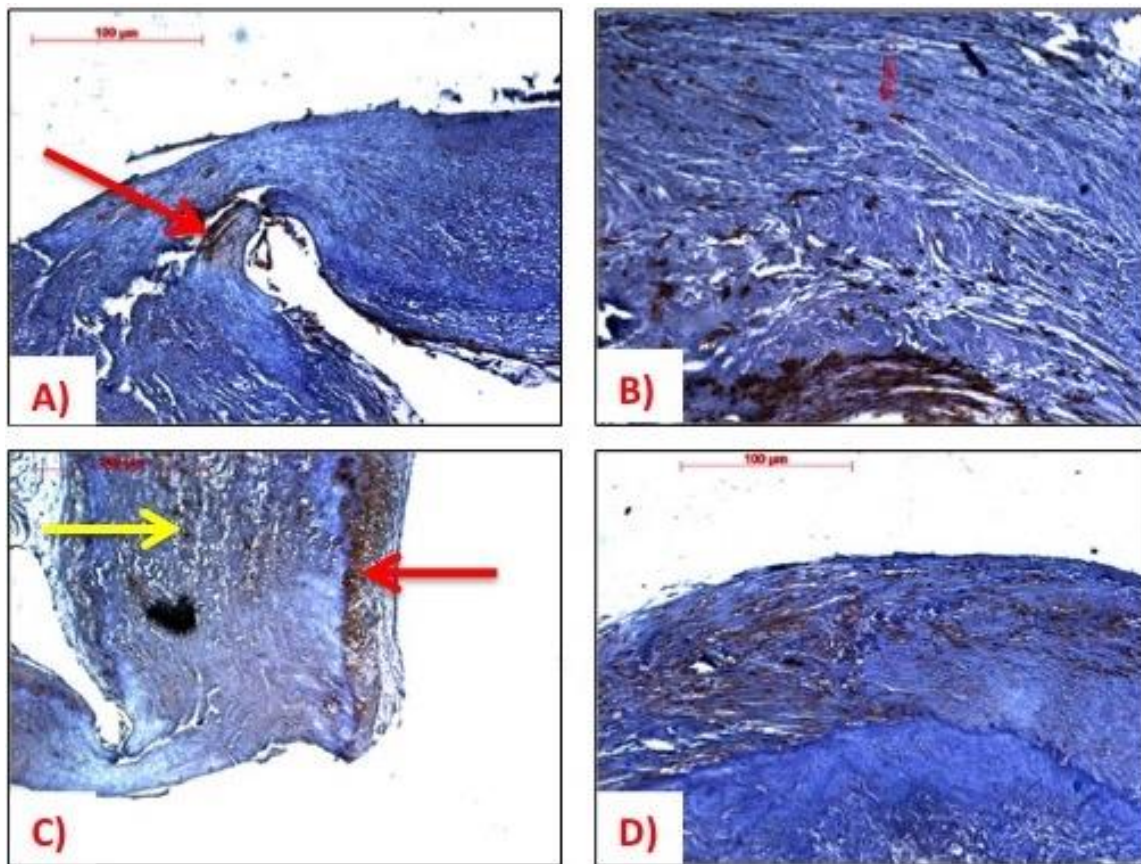
**Abbildung 25: Histologische Analyse von BI 3.** **A)** Von-Kossa-Färbung: Nachweis von Verkalkungen unterhalb der Besiedlungszellschicht an der Segelbasis. **B)** Aktin-Färbung: Segelbasis der Ventrikularis mit Nachweis eines Zellverbandes von Muskelzellen. **C)** Aktinfärbung: Übergang von Segelbasis zu Segelmitte mit in die Segelmatrix einwachsenden Muskelzellen, ausgehend von der Besiedlungszellschicht (Pfeil). **D)** CD31-Färbung: Segelbasis an der Ventrikularis mit Nachweis von Endothelzellen an der Oberfläche und innerhalb der Besiedlungszellschicht mit Nachweis von CD31-positiven Zellen an der Übergangzone von Zellschicht zur Segelmatrix (Pfeil).

**BI 4:** In den Schnitten der H.E.-Färbung zeigte sich eine deckende mehrschichtige Besiedlungszellschicht an der Segelbasis der Ventrikularis (Abb. 26A). An der Übergangszone von Zellschicht zu nativer Klappe waren Auflockerungen und Destruktionen, die teilweise von Fibrinansammlungen begleitet wurden. Zudem wies die Besiedlungszellschicht Zellkonglomerate auf, die als CD31<sup>+</sup>-Zellen in der entsprechenden Färbung identifiziert werden konnten (Abb. 27C+D). Die Ergebnisse der M.P.-Färbung deckten sich mit der H.E.-Färbung, weiterhin zeigten sich in den Schnitten dieser Färbung Muskelzellen an der Nahtstelle sowie Fibrin, welches sich in die Segelbasis ausbreitete (Abb. 26B). Die Segelspitzen waren im Vergleich von Segelbasis zu Segelmitte und –spitze minimal bis gar nicht besiedelt und wiesen Fibrinansammlungen unterhalb der Ventrikularis auf. Es traten vereinzelt Verkalkungen in der Segelbasis auf (Von-Kossa: Grad II; Abb. 26D). Durch die Aktin-Färbung konnten Muskelzellen im Bereich der Nahtstellen nachgewiesen werden (Abb. 27A). Die Besiedlungszellschicht war an der Segelbasis und –mitte ubiquitär vorhanden und zeigte Muskelzellen auf, die weit in die Segelmatrix einwuchsen (Aktin: Grad III; Abb. 27B). Die Segelspitzen waren frei von einer Zellschicht und zeigten keine Muskelzellen. Eine oberflächlich-deckende Zelllinie, die Endothel entsprach, war vereinzelt zu erkennen (CD31: Grad II). Vielmehr sind Zelansammlungen an der Übergangszone von nativer Klappe zur Besiedlungszellschicht CD31<sup>+</sup> gefärbt. Vereinzelt konnten diffus gefärbte Zellen in der Spongiosa der Segelbasis nachgewiesen werden (Abb. 27C). Es wurde keine Endothelzellen an der Segelspitze gefärbt.





**Abbildung 26: Histologische Analyse von BI 4.** **A)** H.E.-Färbung: Segelbasis der Ventrikularis mit Nachweis einer deckenden Besiedlungszellschicht mit Auflockerungen und Fibrinansammlungen (Pfeil) an der Übergangszone von Klappe zur Zellschicht. Innerhalb der Besiedlungszellschicht zeigt sich ein Zellkonglomerat **B)** M.P.-Färbung: Muskelzellen und Fibrin in Zugrichtung zur Naht sowie Fibrin innerhalb der Segelmatrix unterhalb der Besiedlungszellschicht (Pfeil). **C)** M.P.-Färbung: Segelbasis mit aufliegender Besiedlungszellschicht und Fibrinansammlungen unterhalb der Besiedlungszellschicht. Außerdem zeigten sich Muskelfasern in der Spongiosa. **D)** Von-Kossa-Färbung: Nachweis von Verkalkungen an der Segelbasis.

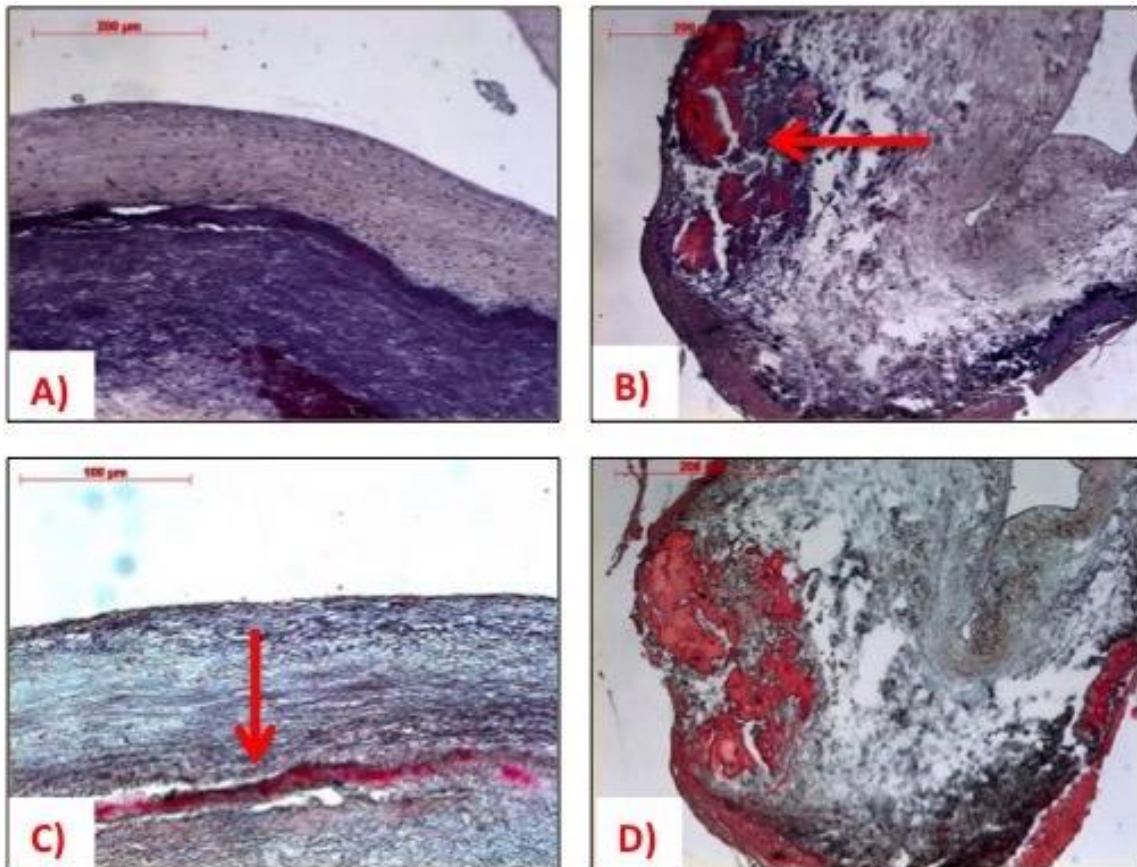


**Abbildung 27: Histologische Analyse von BI 4.** **A)** Aktin-Färbung: Nachweis von Muskelzellen in Zugrichtung zur Naht (Pfeil). **B)** Aktin-Färbung: Nachweis von eingewachsenen Muskelzellen innerhalb der Segelbasis bei aufliegender Besiedlungszellschicht (unterer Bildrand). **C)** CD31-Färbung: CD31<sup>+</sup>-Zellen an der Übergangszone der Besiedlungszellschicht (roter Pfeil) sowie Endothelzellen an der Oberfläche der Besiedlungszellschicht. Vereinzelt CD31<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der Spongiosa der Segelbasis (gelber Pfeil). **D)** CD31-Färbung mit Nachweis von CD31<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der Besiedlungszellschicht an der Ventrikularis sowie an der Oberfläche.

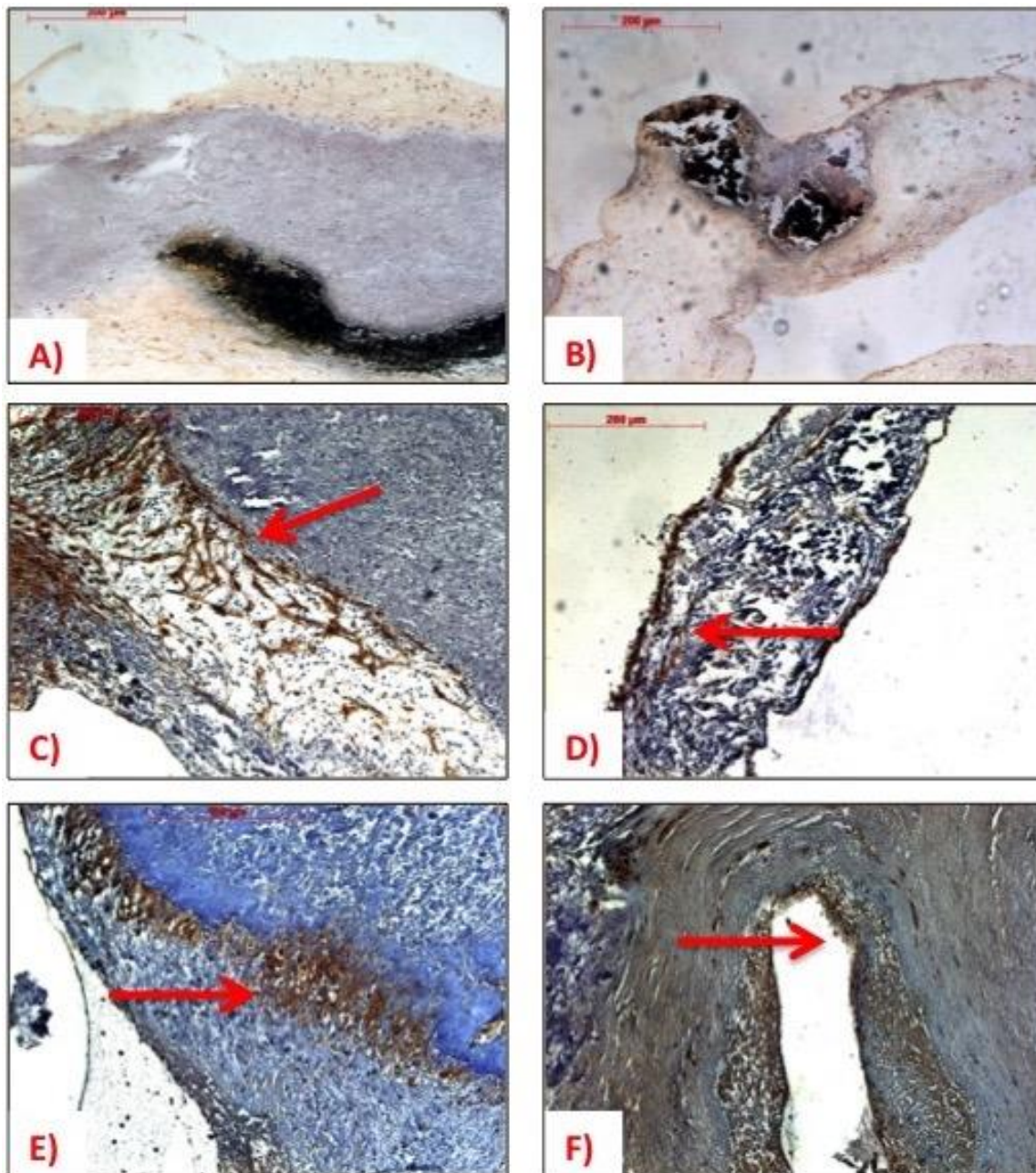
**BI 5:** In den Übersichtsfärbungen zeigte sich eine regelmäßig ausgebildete Besiedlungszellschicht an der Segelbasis und –mitte der Ventrikularis (Abb. 28A+C). Die Segelspitze war frei von einer Zellschicht, diese Ergebnisse deckten sich mit den immunhistochemischen Färbungen. Es kam am Übergang von Zellschicht zur Klappenmatrix zu Auflockerungen und Fibrinansammlungen, teilweise begleitet von Zellansammlungen (Abb. 28B-D). Verkalkungen traten unterhalb der Besiedlungszellschicht in der Klappenmatrix an der Segelbasis auf, vereinzelt auch in der Segelmitte (Von-Kossa: Grad II; Abb. 29A+B). Die Orte der Verkalkungen deckten sich mit den Fibrinansammlungen in den Schnitten der M.P.- und H.E.-Färbung. Die Besiedlungszellschicht wies einen Zellverband aus Muskelzellen mit teilweise in die Segelmatrix einwachsenden Zellen auf, zumeist an der Segelbasis, vereinzelt auch in der Segelmitte (Aktin: Grad III; Abb. 29C+D). Die Segelspitze war frei von Muskelzellen. Im Bereich der



Segelbasis konnten vereinzelt Endothelzellen an der Oberfläche der Besiedlungszellschicht nachgewiesen werden (Abb. 29E). CD31<sup>+</sup>-Zellen wurden mehrfach an den Übergängen von Besiedlungszellschicht zu nativer Klappe nachgewiesen (CD31: Grad II; Abb. 29F).



**Abbildung 28: Histologische Analyse von BI 5.** **A)** H.E.-Färbung: Nachweis einer regelmäßig ausgebildeten Besiedlungszellschicht an der Segelbasis der Ventrikularis mit deckender Zellschicht an der Oberfläche. Es zeigten sich geringfügige Auflockerungen unterhalb der Zellschicht. **B)** H.E.-Färbung: Segelmitte mit Destruktionen und Fibrinansammlungen innerhalb der Segelmatrix unterhalb der Besiedlungszellschicht (Pfeil). **C)** M.P.-Färbung: Segelbasis mit regelmäßig ausgebildeter Besiedlungszellschicht an der Ventrikularis und Fibrinansammlungen unterhalb der Besiedlungszellschicht (Pfeil). Die Besiedlungszellschicht wies eine oberflächliche deckende Zellschicht auf. **D)** M.P.-Färbung: Segelmitte mit Nachweis von Destruktionen und Fibrinansammlungen auf Seite der Ventrikularis unterhalb der Besiedlungszellschicht.



**Abbildung 29: Histologische Analyse von BI 5.** **A)** Von-Kossa-Färbung: Segelbasis mit aufliegender Besiedlungszellschicht und einer Verkalkung innerhalb der Klappenmatrix. **B)** Von-Kossa-Färbung: Segelmitte mit Nachweis einer Verkalkung und einer geringgradig ausgeprägten Besiedlungszellschicht. **C)** Aktin-Färbung: Segelbasis mit Nachweis eines muskulären Zellverbandes sowie vereinzelt in die Segelmatrix infiltrierende Zellen (Pfeil). **D)** Aktin-Färbung: Segelmitte mit Nachweis von einschichtigen Muskelzellen an der Oberfläche sowie vereinzelt in die Segelmatrix einwachsenden Muskelzellen (Pfeil). **E)** CD31-Färbung: Segelbasis mit Endothelzellen an der Oberfläche der Besiedlungszellschicht und CD31<sup>+</sup>-Zellen am Übergang von Zellschicht zur Segelmatrix (Pfeil). **F)** CD31-Färbung: Segelbasis mit Nachweis einer Endothelzellschicht an der Oberfläche der Besiedlungszellschicht.

### 3.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse von BI 1-5

**H.E.-Färbung:** In allen Schnitten konnten Zellkerne in Zugrichtung zur Naht nachgewiesen werden, welche konzentrisch angeordnet waren. Im Bereich der Nahtstelle breiteten sich destruktive Prozesse bis in die Segelbasis aus. Ausgehend von der Segelbasis nahm die Höhe der Besiedlungszellschicht hin zur Segelmitte kontinuierlich ab, bis kein Nachweis einer Zellschicht mehr zu erbringen war. Vorwiegend war die Besiedlungszellschicht an der Ventrikularis nachzuweisen. An den Kontaktstellen von Besiedlungszellschicht zur Klappe konnten Destruktionen und Unterbrechungen der strukturellen Integrität, verbunden mit teilweise ausgeprägten Zellansammlungen nachgewiesen werden. Die Oberfläche der Besiedlungsschichten wies vereinzelt eine einschichtige deckende Zellschicht auf, welche an der Segelspitze nicht regelmäßig zu erkennen war.

**M.P.-Färbung:** Die intensiv-roten Färbungen, vor allem an den Nahtstellen und an den Übergangszonen von Besiedlungszellschichten und Klappen entsprachen Ansammlungen von Fibrin, die roten Färbungen entsprachen muskulärem Gewebe. Das Ausmaß von Destruktionen deckte sich mit den Ergebnissen der H.E.-Färbung. Die Fibrosa im Bereich der Segelmitte und der Segelspitze war durch vereinzelte Einkerbungen geprägt, die Fibrinansammlungen aufwiesen. Unterhalb der Oberfläche der Ventrikularis fanden sich ebenfalls vereinzelt Fibrinester. Die Besiedlungszellschichten waren durch eine grün-türkise Grundsubstanz gekennzeichnet, die der Färbung der Extrazellulärmatrix der Klappen entspricht. Durchsetzt wurde die retikuläre Struktur durch rötliche Zellen, die sich auch an der Oberfläche der Besiedlungszellschichten im Bereich der Segelbasis als geschlossene Zellschicht darstellten. Der Nachweis einer geschlossenen Zellschicht in den Segelmitten und –spitzen war nur vereinzelt möglich. Innerhalb der Besiedlungszellschicht an der Segelbasis wurden blutgefäßähnliche Strukturen nachgewiesen.

**Von-Kossa-Färbung:** Verkalkungen traten in allen Schnitten der untersuchten Klappen an den Nahtstellen und im räumlichen Bezug dazu an der Segelbasis auf. In den Bindegewebsfärbungen zeigten sich an Übergängen von Klappen zu Zellschichten Destruktionen, Fibrinansammlungen und Zellkonglomerate. Durch die Von-Kossa-Färbung wurden in diesen Bereichen Verkalkungen festgestellt. Die Besiedlungszellschichten zeigten sich vereinzelt gräulich verfärbt, was auf eine mögliche beginnende Verkalkung hinweisen kann.

**CD31-Färbung:** Es wurden an der Segelbasis der verschiedenen Schnitte vereinzelt deckende positive Färbungen im Sinne einer kontinuierlichen Endothelzellschicht nachgewiesen. Die Segelmitte und die Segelspitzen wiesen schwach positive Färbungen auf, mitunter auch keinen Zellenachweis. Zellansammlungen an der Nahtstelle und im Bereich der Übergangszone von Klappe zur Besiedlungszellschicht, welche in den vorherigen Färbungen mit Fibrinansammlungen und entzündlichen Prozessen vergesellschaftet sind, färbten sich in BN 1, 3, 4 und 5 positiv. Vereinzelt konnten Zellen in der Spongiosa der Klappe mit einer positiven Färbung beobachtet werden. Die blutgefäßähnlichen Strukturen im Bereich der Segelbasis weisen endoluminale Endothelzellen auf.

**Aktin-Färbung:** In den Schnitten der Aktin-Färbung zeigten sich positive Zellfärbungen innerhalb der Besiedlungszellschicht sowie innerhalb der untersuchten Klappe bei vorliegender Infiltration. Infiltrationen durch Muskelzellen konnten nur bei aufliegender Besiedlungszellschicht gefunden werden, somit vorrangig an der Segelbasis der Ventrikularis und teilweise an der Segelmitte. Innerhalb der Besiedlungszellschicht konnte man bei allen Versuchstieren die Entstehung eines Zellverbandes erkennen. Stark positiv färbten sich an allen Nahtstellen die Zellen in Zugrichtung der Naht an. Innerhalb der Spongiosa und im Bereich der Segelbasis konnten schwach positive flächige Färbungen nachgewiesen werden, die am ehesten einer nicht vollständigen Entfernung im Rahmen der Dezellularisierung entsprechen.

**Tabelle 12:** Übersicht der Ergebnisse der Versilberungs- und immunhistochemischen Färbungen

	BN 1	BN 2	BN 3	BN 4	BN 5	BI 1	BI 2	BI 3	BI 4	BI 5
Von-Kossa	Grad 0	Grad 0	Grad 0	Grad 0	Grad 0	Grad III	Grad II	Grad III	Grad II	Grad II
Aktin	Grad I	Grad I	Grad I	Grad I	Grad I	Grad III	Grad III	Grad III	Grad III	Grad III
CD31	Grad I	Grad 0	Grad I	Grad I	Grad 0	Grad II	Grad III	Grad II	Grad II	Grad II

## 4. Diskussion

In dieser Doktorarbeit wurden autologe tissue-engineerte Herzklappen, welche aus einer porcinen Matrix bestanden, unter Verwendung eines minimal-invasiven Verfahrens in Schafe implantiert und die Re-Besiedlung mit Endothelzellen und Myofibroblasten analysiert. Porcine Herzklappen wurden dezellularisiert, mit autologen Myofibroblasten besiedelt und anschließend reendothelialisiert. Nach anschließender Zellkonditionierung wurden die Klappen implantiert. Nach einer *in vivo*-Verweildauer von einem Monat wurden die tissue-engineerten Herzklappen explantiert und hinsichtlich der Effektivität der Dezellularisierung, der Rebesiedlung mit Endothelzellen und Myofibroblasten sowie der Produktion eines extrazellulären Gewebeverbandes und des Auftretens von Verkalkungen mit besiedelten, aber nicht-implantierten Kontrollklappen verglichen.

### 4.1. Dezellularisierung

Ziel einer Dezellularisierung ist es, sämtliche Fremdstrukturen, die eine inflammatorische Reaktion auslösen und damit zur Abstoßung des Transplantates oder Deformierung der Herzklappen führen können, wie beispielsweise DNA und Zellen, zu entfernen. Gleichzeitig sollten die extrazelluläre Matrix und deren Struktur möglichst vollständig erhalten bleiben. Hierfür bedient man sich physikalischer (Agitation, Frost), chemischer (Detergenzien, hypo-/hypertone Puffer) und biologischer (biologische Agenzien, Chelatoren) Methoden [57]. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunreaktion des Empfängerorganismus auf ein xenogenes nicht-dezellularisiertes Transplantat die Langlebigkeit dieses Transplantates reduziert und zu Re-Operationen führt [58]. Die Minimierung einer immunologischen Abstoßungsreaktion mittels Dezellularisierung zur Verbesserung der Langlebigkeit einer Herzklappenprothese stellt eine mögliche Lösung dieser Problematik dar. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Dezellularisierung entscheidend zur Langlebigkeit und Funktionalität einer Ersatzklappe beiträgt. Da Costa et al. zeigten eine deutliche Reduktion immunologischer Reaktionen bei dezellularisierten humanen Allografts im Langzeitversuch [59]. Nicht-dezellularisierte humane Allografts hingegen verursachten immunologische Abwehrreaktionen aufgrund einer nachgewiesenen gewährten Zellviabilität [60]. Die Folgen einer nicht vollständigen Dezellularisierung von Xenografts konnten in den nachfolgend auf-



geführten Studien gezeigt werden. Bei der Verwendung des Matrix P Plus®-Conduits im Rahmen von RVOT-Rekonstruktionen bei angeborenen Herzfehlern traten Zeichen einer Inflammation und Stenose auf [61]. Der Einsatz des Synergraft®-Conduits führte zu ausgeprägten Kalzifizierungen und immunologischen Abstoßungsreaktionen, die ebenfalls Stenosierungen verursachten [62]. Als Ursache wird eine persistierende Matrix-Immunogenität des porcinen Grundgerüsts nach unzureichender Dezellularisierung angesehen. Die Entfernung von Zellkernen und –bestandteilen ist zusätzlich auch essentiell, um Freiraum zu schaffen, damit autologe Zellen sich ansiedeln, in das Gewebe einwachsen und proliferieren können [63].

In dieser Studie wurden Herzklappen verwendet, deren Dezellularisierungsprotokoll auf einer Kombination aus Agitation (Rotationsbewegungen des Inkubators) und enzymatischem Verdau (Trypsin/EDTA-Lösung) basierte. Alle Herzklappen wurden auf den Verbleib xenogener Zellen und auf Hinweise einer strukturellen Beeinträchtigung des Klappengewebes untersucht. In nicht-implantierten Klappen wurden Muskelzellen und Aktinfasern im Bereich der Nahtstellen und Aktinfasern am Übergang von Klappenwand zur Segelbasis nachgewiesen (z.B. Abb. 13 und 14). Auch die Analyse der besiedelten und implantierten Klappen ergab übereinstimmende Ergebnisse bezüglich des Nachweises residueller Zellen in der porcinen Matrix. Hier zeigten sich ebenfalls Muskelzellen und Aktinfasern an den Nahtstellen und Aktinfasern am Übergang von Klappenwand zur Segelbasis (z.B. Abb. 21 und 23). Diese Ergebnisse deuten auf einen unvollständigen Dezellularisierungsprozess hin.

Die Anwendung von Trypsin/EDTA als enzymatische Dezellularisierungsmethode für porcine Herzklappen wurde von Steinhoff et al. eingeführt [64] und findet seitdem eine breite Verwendung in der Erforschung tissue-engineerter Herzklappen. Es herrscht jedoch Uneinigkeit über die Effektivität der Zellkernentfernung dieser Methode. Rieder et al. [65] und Kasimir et al. [66] fanden nach der Dezellularisierung porciner Herzklappen verbleibende xenogene Zellen in der Klappenmatrix, hingegen berichteten Meyer et al. über eine vollständige Dezellularisierung von Herzklappen-Allografts im Nagetiermodell [67].

In zwei der besiedelten nicht-implantierten Klappenstents wurden Auflockerungen des Klappengewebes nachgewiesen (Abb. 5 und 13). Ähnliche Ergebnisse wurden von zwei Forschergruppen beschrieben. Sie fanden heraus, dass es im Rahmen der Dezellularisierung mit Trypsin zu einer ausgeprägten Schädigung der Extrazellulärmatrix mit Beeinträchtigung der Kollagenstruktur, Entfernung von Laminin, Fibronectin, Elastin und zum Auswaschen von

Glykosaminoglykanen kam [57, 66, 68]. Weiter wurde gezeigt, dass die Schädigung der Struktur der Extrazellulärmatrix bei der Dezellularisierung mittels Trypsin/EDTA zu einer Beeinträchtigung der Klappenfunktionalität, des Zellwachstums und der Zellmigration führen kann [69].

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Hauptziele der Dezellularisierung gleichzeitig die Kernproblematik bei diesem Prozess darstellen, da die Dezellularisierungsverfahren mit einer Schädigung der extrazellulären Matrix einhergehen können.

Eine mögliche Alternative stellt die Dezellularisierung mit dem ionischen Detergens Natriumlaurylsulfat (engl: sodium dodecyl sulfate (SDS)) und Desoxycholsäure (engl: sodium deoxycholate (SD)) dar. Bei dem Vergleich von Trypsin/EDTA mit SDS/SD konnte gezeigt werden, dass SDS/SD neben den Taschenklappen auch die Klappenwand und subvalvulär gelegene myokardiale Strukturen vollständig dezellularisierte, Trypsin/EDTA jedoch nur die Taschenklappen von Zellen befreite [70]. Eine weitere Möglichkeit, um ein besseres Eindringen der Dezellularisierungslösung in das porcine Grundgerüst zu ermöglichen, besteht in der Änderung der Arbeitsschritte des Dezellularisierungsprozesses. Anstelle des primären Einnähens des Stents und anschließendem Dezellularisieren könnte eine primäre Dezellularisierung vor Einnähen der porcinen Herzklappe in den Stent eine Verdichtung der Klappenmatrix im Bereich der Nahtstelle vermeiden und eine vollständige Entfernung der xenogenen Zellen ermöglichen.

## **4.2. Besiedlung des Grundgerüsts mit autologen Endothelzellen und Myofibroblasten**

Die Idee des kardiovaskulären Tissue Engineerings besteht in der Herstellung einer Ersatzklappe, welche die Funktionalität, den Aufbau und die Struktur einer nativen Klappe aufweist. Endothelzellen und glatte Muskelzellen erfüllen als Bestandteil der Zellzusammensetzung einer nativen Klappe grundlegend wichtige Aufgaben, die zur Zellviabilität und Funktionalität dieser beitragen. Ein lebender Zellverbund ist wichtig, um die xenogenen Matrixkomponenten zu resorbieren und gleichzeitig neue Matrixkomponenten zu synthetisieren [71]. So nehmen vor allem Fibroblasten und Myofibroblasten eine entscheidende Rolle bei der Synthese von Kollagen und Aktinfasern ein. Vor allem Kollagen I, II und IV tragen bedeutend zur Langzeitstabilität einer Herzklappe bei [72]. Myofibroblasten beteiligen sich zudem an der Wundheilung, indem sie Kontraktions- und Retraktionsphasen während des Gewebeum-



baus ermöglichen [73]. Auch die Entstehung einer konfluenten Endothelzellschicht ist erst nach vorheriger Besiedlung mit Fibroblasten möglich [74]. Die Stabilität des Endothelzellverbandes sowie die Verbindung dieser Zellschicht mit der darunterliegenden Oberfläche hängt entscheidend von dem Vorhandensein extrazellulärer Matrixproteine, vor allem von Kollagen IV in der Basalmembran des jeweiligen Gewebeverbandes ab. Fibroblasten synthetisieren die oben genannten erforderlichen extrazellulären Matrixbestandteile und schaffen so physiologische Bedingungen für Endothelzellen zur besseren Haftung und Synthese von Proteinen.

Eine funktionierende Endothelzellschicht schützt unter anderem vor Infektionen [75], des Weiteren spielen Endothelzellen eine Rolle bei der Modulation darunterliegender interstitieller Zellen in der Klappe [76]. Lichtenberg et al. verglichen die Verwendung von dezellularisierten und besiedelten Xenografts im Schafmodell und zeigten, dass eine Reendothelialisierung mit autologen Endothelzellen zu einer verminderten Thrombosierung und Neointimaproliferation führte [51]. Die Ergebnisse deckten sich mit Beobachtungen bei der Verwendung dezellularisierter Herzklappen von Cebotari et al. und Andrews et al., die bei Abwesenheit von Endothelzellen ebenfalls eine Neigung zu thrombotischen Auflagerungen und einer Neointimaproliferation beschrieben [77, 78].

Das Bestreben nach einer möglichst langen Haltbarkeit und Verträglichkeit einer Klappenprothese führte dazu, dass frühzeitig die Besiedlung mittels Endothelzellen im Rahmen des Tissue Engineering in den Fokus der Forschung rückte. MacGregor et al. besiedelten dafür 1979 erstmals mechanische Herzklappenprothesen mit Endothelzellen [79]. Es folgte 1993 der Versuch von Bengtsson et al., besiedelte mechanische Klappen bei Schafen in Pulmonalposition zu implantieren [80]. Die Besiedlung stellte sich als durchführbar dar, jedoch zeigte sich, dass die Zellschicht auf Oberflächen metallischen Ursprungs einer *in vivo*-Belastung nicht standhalten kann. Folglich rückte die Zellbesiedlung von Xenografts vermehrt in den Vordergrund. Fischlein et al. untersuchten die Anwendung zuvor mit Endothelzellen besiedelter glutaraldehydfixierter Klappenprothesen [81], allerdings stellte es sich als schwierig heraus, eine deckende Endothelzellschicht aufgrund der Zytotoxizität und Beeinflussung der Bindegewebsmatrix von Glutaraldehyd zu erzeugen.

Die Verwendung tissue-engineerter Herzklappen auf Grundlage dezellularisierter xenogener Matrices - wie in dieser Studie - stellt eine mögliche Lösung für die erfolgreiche Rebesiedlung mit autologen Zellen dar.

Sowohl die nicht-implantierten Klappen (BN) als auch die implantierten Klappen (BI) wurden in dieser Arbeit histologisch untersucht, um die Verteilung der autologen Endothelzellen und Myofibroblasten vor und nach Implantation zu ermitteln. Es zeigte sich eine erfolgreiche Re-Besiedlung der porcinen dezellularisierten Matrix mit den vorher kultivierten Myofibroblasten und Endothelzellen in der nicht-implantierten Kontrollgruppe (BN) vorrangig an der Segelbasis ohne Nachweis einer Infiltration von Aktin-positiven Zellen (Abb. 6 und 8). Vereinzelt wurden Endothelzellen und Myofibroblasten in der Segelmitte nachgewiesen. Die Segelspitze wies keine zusammenhängende Besiedlungszellschicht auf.

Auch in der Gruppe der besiedelten implantierten Herzklappen (BI) wurden vor allem an der Segelbasis Myofibroblasten (Abb. 29) und Endothelzellen (Abb. 23) nachgewiesen. Die Ausprägung der Besiedlung nahm zur Segelmitte hin ab, hier zeigten sich im Vergleich zur Basis weniger Myofibroblasten (Abb. 29) und Endothelzellen. Die Segelspitzen wiesen eine schwach positive Färbung für Endothelzellen auf (Abb. 23).

Es wurden jedoch Unterschiede in Besiedlungsdichte und -bereichen der Xenografts im Vergleich der beiden Gruppen deutlich. Die Besiedlungszellschicht der implantierten Klappen war deutlich stärker ausgeprägt als in den nicht implantierten Klappen. Dies spricht für eine erfolgreiche Vermehrung und Viabilität der Zellen *in vivo* und für die Ausbildung eines Zellverbandes. Zudem wurden Infiltrationen Aktin-positiver Zellen (Abb. 23, 25, 27 und 29) und die Entstehung eines Zellverbandes innerhalb der Matrix bei aufliegender Besiedlungszellschicht in der BI-Gruppe beobachtet, was wahrscheinlich auf das Einwachsen der autologen Myofibroblasten zurückzuführen ist. Im Vergleich zur arteriellen Seite der Klappe war die Besiedlungszellschicht an der ventrikulären Seite stärker angelegt.

Während der Bereich der Segelbasis und Gefäßwand in beiden Gruppen stark besiedelt war, ließ die Ausprägung der Zellschicht zur Segelmitte hin ab und die Zellen erreichten die Segelspitze nur vereinzelt. Eine vergleichbare Rezellularisierung wurde von Quinn et al. bei der Implantation dezellularisierter Pulmonalklappen im Schafmodell für 5 Monate beobachtet, welche primär an der Basis der Taschenklappen und der Gefäßwand nachzuweisen war. In der Segelmitte und –spitze wurden hierbei nur vereinzelt Zellen gefunden. Eine Infiltration der Zellen in die Matrix erfolgte ebenfalls nur in den rezellularisierten Bereichen [82]. Honge et al. konnten ähnliche Befunde bei Implantation auch bei nur dezellularisierten Aortenklappen in Schweinen und einer *in vivo*-Verweildauer von 6 Monaten feststellen. Die Reendothelialisierung und das Einwachsen von Fibroblasten wurde hauptsächlich an der Segelbasis und

Gefäßwand nachgewiesen, hingegen war die arterielle Seite und die Segelspitze nicht rezellularisiert [83].

Die unterschiedliche Ausprägung der Rebesiedlung der Taschenklappen mit Zellen kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen ist es denkbar, dass aufgrund des vergleichsweise lockeren Aufbaus der Lamina spongiosa mit Glykosaminoglykanen unterhalb der Ventrikularis eine Besiedlung der ventrikulären Seite mit Einwachsen der Zellen in die Lamina spongiosa einfachere Voraussetzungen bietet. Hingegen stellt der dichte Aufbau der Lamina fibrosa mit zahlreichen Kollagenquerverbindungen ein Hindernis für die schnelle Rebesiedlung und das Einwachsen von Zellen dar. Eine weitere Erklärung bezieht sich auf die Druck- und Strömungsverhältnisse an der ventrikulären und arteriellen Seite der Taschenklappen. Während der Klappenöffnungsphase wird die arterielle Seite der Tasche gegen die Klappenwand gedrückt und es kommt zu einer „Quetschung“ des Gewebes. Das Blut fließt nach Ventrikelkontraktion linear entlang der ventrikulären Seite, nach Klappenschluss entstehen aufgrund des aus der Arterie zurückfließenden Blutstromes Turbulenzen in unmittelbarem Kontakt zur arteriellen Seite und die Klappe wird gedehnt. Sowohl die „Quetschung“ des Gewebes als auch die Turbulenzen des Blutstroms auf der arteriellen Seite beim Klappenschluss schaffen ungünstige Voraussetzungen für die Haftung und das Einwachsen von Zellen. Die Lamina spongiosa könnte aufgrund des hohen Anteils an Glykosaminoglykanen und lockerem kollagenem Bindegewebe eine Schutzfunktion für die Ventrikularis erfüllen und hierdurch bessere Voraussetzungen für das Einwachsen von Besiedlungszellen bieten. Zudem zeigten Song et al., dass ein linearer Blutfluss, wie er in der Austreibungsphase des Herzens an der Oberfläche der Ventrikularis auftritt, eine Proliferation von Endothelzellen fördert [84]. Somit könnte die stärkere Ausprägung der Besiedlungszellschicht auf Seite der Ventrikularis im Vergleich zur arteriellen Seite erklärt werden.

Eine Möglichkeit, die Verteilung der Zellen hin zur Segelspitze zu optimieren, besteht in der Verlängerung der Implantationszeit. Goldstein et al. konnten bei der Verwendung dezellularisierter porciner Herzklappen eine signifikante Zunahme der Rezellularisierungsdichte bei einer Vergleichsgruppe nach 11 Monaten *in vivo*-Verweildauer im Schaf beobachten, während die Gruppe nach 5 Monaten *in vivo*-Verweildauer eine spärlichere Besiedlung aufwies. Außerdem entsprach die Zellzusammensetzung der Langzeitversuchsgruppe dem einer nativen Klappe mit hohem Anteil an Fibroblasten und glatten Muskelzellen [45].

### 4.3. Überblick: Autologe Zellen zur Besiedlung der Herzklappen

An das optimale zelluläre Ausgangsmaterial für das Tissue Engineering werden viele verschiedene Anforderungen gestellt, unter anderem eine suffiziente Produktion der Extrazellulärmatrix mit gleichzeitig hoher Abbaurate des xenogenen Biomaterials, eine autologe Herkunft der Zellsorte zur Minderung der Immunogenität und eine ausgeprägte Plastizität der Zellen. Es werden viele verschiedene Zelltypen mit den oben aufgeführten Charakteristika zur Verwendung im Tissue Engineering untersucht und diskutiert.

Bislang stellen autologe Zellen vaskulären Ursprungs den bevorzugt verwendeten Zelltyp bei der Besiedlung von Matrices im Rahmen der Herstellung von tissue-engineerten Herzklappen dar [85]. In dieser Studie wurden arterielle Biopsien der Arteria carotis der Schafe gewonnen. Solange sich die Erforschung dieser Zellquelle im Stadium der präklinischen Forschung befindet, ist dieses Verfahren praktikierbar. Bei der klinischen Verwendung am Patienten ist dies jedoch nicht durchführbar. Alternativ kann auf die Gewinnung von Zellen aus Venen zurückgegriffen werden. Hoerstrup et al. untersuchten die Unterschiede in der Gewebeentwicklung und Zellbeschaffenheit von venösen und arteriellen Myofibroblasten als Zellquelle und konnten keine Unterschiede in den Vergleichsgruppen feststellen [86]. Somit stellen venöse Biopsien eine mögliche Alternative für die Verwendung beim Tissue Engineering dar. Allerdings stellt sich die Frage, ob die Eigenschaften und die Funktionalität autologer Endothelzellen und Myofibroblasten venösen Ursprungs den vorherrschenden Druckverhältnissen und Anforderungen einer suffizienten valvulären Klappenfunktion gerecht werden können.

Auch die unterschiedliche ursprüngliche Herkunft von Endothelzellen kann die spätere Funktionalität bei der Verwendung, wie z.B. der Herstellung von Herzklappen, beeinträchtigen. Butcher et al. untersuchten die Reaktion von aortalen und valvulären Endothelzellen auf unterschiedliche Strömungsverhältnisse. Es zeigte sich, dass valvuläre Endothelzellen eine senkrechte Anordnung zur Flussrichtung einnahmen, wohingegen vaskuläre Endothelzellen sich parallel zur Flussrichtung anordneten [87]. Die verschiedene Anordnung und Reaktion vaskulärer Endothelzellen auf mechanische Kräfte könnte eine weitere Erklärung für eine unzureichende Endothelzellfunktion der in dieser Arbeit verwendeten Zellen erklären.

Eine weitere aussichtsreiche Zellgruppe stellen endotheliale Progenitorzellen (EPZ) dar, die zur Gruppe der CD133<sup>+</sup>-Zellen gehören. Vorteil dieser Zellen ist ihre mögliche Isolierung aus Nabelschnurblut, Fruchtwasser, Knochenmark oder peripherem Blut [88-91]. Eine Studie von

Boldt et al. aus unser Arbeitsgruppe konnte bei dem Vergleich isolierter autologer Myofibroblasten und Endothelzellen aus den Karotiden mit endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark ein stärkeres Einwachsen der CD133<sup>+</sup>-Zellen in eine dezellularisierte xenogene Matrix, weniger Nachweise inflammatorischer Prozesse und eine geringeres Auftreten von Verkalkungen beobachten [49].

Die autologen Myofibroblasten und Endothelzellen der Vergleichsgruppe sowie die Versuchsanordnung zur Herstellung der tissue-engineerten Klappe der oben aufgeführten Studie waren gleichartig zu den in dieser Doktorarbeit verwendeten Zellen und angewandten Verfahren. Die Analyse der Besiedlungszellpopulation mittels Immundetektion (Western Blot) ergab bei den Untersuchungen von Boldt et al., dass es sich bei der Endothelzellpopulation um eine heterogene Mischpopulation aus Endothelzellen und Myofibroblasten handelte und somit nicht um eine reine Endothelzellfraktion. Insofern ist davon auszugehen, dass es sich auch bei den in dieser Arbeit unter identischen Voraussetzungen gewonnenen Zellen um eine Mischpopulation handelt und somit die Endothelfunktion beeinträchtigt werden kann. Konsekutiv wäre dann – wie in dieser Doktorarbeit beobachtet - ein vermehrtes Auftreten von Entzündungen, Infektionen und Verkalkungen bei der Besiedlung mit autologen Endothelzellen und Myofibroblasten im Vergleich zu endothelialen Progenitorzellen zu erklären.

In der Gruppe der besiedelten und implantierten Herzklappen (BI) wurde - wie unter 4.2. dargestellt - eine Infiltration von Aktin-positiven Zellen nachgewiesen, gleiches konnten auch Boldt et al. in der Vergleichsgruppe der CD133<sup>+</sup>-Zellen feststellen [49]. Jedoch ist es bisher unklar, inwiefern endotheliale Progenitorzellen sich in Myofibroblasten differenzieren können und so die Herkunft der Aktin-positiven Zellen in der oben genannten Vergleichsgruppe erklärt werden kann. Hingegen ist bei den in dieser Arbeit beobachteten Infiltrationen Aktin-positiver Zellen von einwachsenden autologen und zuvor besiedelten Myofibroblasten auszugehen, die für die Funktionsfähigkeit von Herzklappen eine wichtige Rolle einnehmen (siehe oben 4.2.).

Ob Endothelzellen, welche sich z.B. zuvor aus CD133<sup>+</sup>-Zellen differenziert hatten, zu Fibroblasten und glatten Muskelzellen transformiert werden können, ist momentan Gegenstand intensiver Forschung. Im Fokus steht dort ein zellulärer Mechanismus, die Endotheliale-mesenchymale-Transition (engl.: Endothelial-to-mesenchymal-transition, EndMT). Mittels verschiedener Wachstumsfaktoren und inflammatorischer Zytokine konnte gezeigt werden,

dass Endothelzellen zur EndMT angeregt werden können und eine Umwandlung von Endothelzellen hin zu mesenchymalen Stammzellen durchlaufen [92]. Diese Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich unter anderem in Fibroblasten und glatte Muskelzellen zu entwickeln und die Produktion und das „Remodelling“ der extrazellulären Matrix bei Herstellung von tissue-engineerten kardiovaskulären Gewebeprothesen zu erhöhen [93]. Die Integration dieses zellulären Mechanismus in das Tissue Engineering von Herzklappen stellt einen vielversprechenden Ansatz bei der Verwendung von Endothelzellen als autologe Zellen dar.

In letzter Zeit trat die Verwendung von Stammzellen, insbesondere von autologen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark in den Vordergrund der Forschung [94]. Die Gewinnung dieser Zellen gestaltet sich als einfacher und weniger invasiv [95] als bei der Gewinnung arterieller und venöser Biopsien, da sie neben dem Knochenmark potentiell auch aus Umbilikalblut und peripherem Blut gewonnen werden können. Darüber hinaus zeichnen sich Stammzellen durch ein schnelles Wachstum und ein großes Potential aus, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, weshalb sie als eine der am besten geeigneten Optionen bei der Suche nach der optimalen Zellsorte angesehen werden können.

Jüngst ist eine andere Zellgruppe für das Tissue Engineering verfügbar geworden. Yamanaka et al. schafften es, adulte Fibroblasten hin zu einem pluripotenten Zellstatus zu überführen und somit induzierte pluripotente Stammzellen zu gewinnen [96]. Adulte Fibroblasten können aus autologen Hautbiopsien gewonnen werden und anschließend zur Herstellung autologer Herzklappen mittels Stammzellendifferenzierung genutzt werden [97].

#### **4.4. Verkalkungen der Bioprothesen**

Die Versilberung nach Von-Kossa dient der histologischen Darstellung von Verkalkungen, wie sie als Reaktion auf Entzündungsprozesse entstehen können. Zehr et al. stellten einen möglichen Zusammenhang von Immunreaktionen und Verkalkungen einher [98], der dazu führen kann, dass durch Fortschreiten der Verkalkungen eine Versteifung oder Ruptur der Taschenklappe resultiert.

In den nicht-implantierten Klappen traten - mit Ausnahme von zwei Tieren (BN 4 und 5) - keine Verkalkungen auf, wohingegen in allen implantierten Klappen moderate bis ausgeprägte Verkalkungen (Grad II-III) nachgewiesen wurden. Hierbei waren vor allem die Klappenwand sowie der Übergang von Besiedlungszellschicht zur Matrix betroffen. Vereinzelt wurden auch Kalzifizierungen in der Segelmitte und -spitze nachgewiesen.

Als Ursache können verschiedene Gründe angeführt werden. Die Verkalkungen der Klappenwand, insbesondere der Nahtstellen, können zum einen auf unvollständig entfernte porcine Zellen zurückgeführt werden. Sowohl in den histologischen Übersichtsfärbungen als auch in der Aktinfärbung (z.B. Abb. 27) konnten Muskelzellen in Zugrichtung zur Naht nachgewiesen werden, die Ursache einer immunologischen Abstoßungsreaktion sein können. Der schwach positive Nachweis von Aktinfasern am Übergang von Klappenwand zur Segelbasis ist ebenfalls möglicherweise Folge eines unvollständigen Dezellularisierungsprozesses. Es wurde gezeigt, dass der Verbleib von residuellen Zellresten selbst bei gut etablierten Dezellularisierungsverfahren nicht vollständig auszuschließen ist [99].

Simon et al. beobachteten zunächst unspezifische und später spezifische Reaktionen durch Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten gegen dezellularisiertes Gewebe bei der Implantation dezellularisierter porciner Herzklappen, wodurch es zu Kalzifizierungen und Einschränkungen der Klappenfunktion kam [62]. Als Ursache vermuteten sie xenogene Matrixbestandteile.

In BI 1, 3, 4 und 5 zeigten sich CD31<sup>+</sup>-Zellen gehäuft am Übergang von Besiedlungszellschicht zur Klappenmatrix und im Bereich der Nahtstelle. Interessanterweise kolokalisierte die Färbung von CD31<sup>+</sup>-Zellen mit Fibrinansammlungen, massiven Zellansammlungen und Verkalkungen (Abb. 24 – 27 und 29). CD31 ist ein Protein der Immunglobulin-Superfamilie und wird auf der Zelloberfläche von Endothelzellen, besonders im Bereich zwischen benachbarten Zellen exprimiert [100]. Neben Endothelzellen konnte die Expression von CD31 auch auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten und T-Zellen nachgewiesen werden [100]. Möglicherweise wurden in der BI-Gruppe dieser Arbeit neben Endothelzellen auch Entzündungszellen in der CD31-Färbung gefärbt, wodurch die Ergebnisse auf eine entzündliche Reaktion in diesen Bereichen hindeuten. Als Folge einer Entzündung und Verkalkung wäre das Einwachsen der autologen Zellen in die Matrix beeinträchtigt und eine Biodegradierung der xenogenen Matrix unterbunden.

Da das Nahtmaterial, welches die porcine Herzklappe innerhalb des Stents befestigt, nicht resorbierbar ist, könnte hierdurch ebenfalls eine Verkalkung entstehen. Honge et al. beobachteten bei der Implantation dezellularisierter porciner Aortenklappen im Schafmodell ebenfalls vereinzelt Verkalkung im räumlichen Bezug zum Nahtmaterial, welches die Klappe im Stent befestigte [83].



## 4.5. Ausblick

In dieser Doktorarbeit konnte eine erfolgreiche Besiedlung und *in vivo*-Vermehrung autologer Endothelzellen und Myofibroblasten bei der Herstellung und Verwendung der von unserer Arbeitsgruppe entwickelten tissue-engineerten Herzklappen nachgewiesen werden.

Die von uns verwendeten Zellen siedelten sich in dem von uns gewählten Implantationszeitraum primär an der Segelbasis der Ventrikularis und vereinzelt an der Segelmitte an. Jedoch ist eine deckende Besiedlungszellschicht über die gesamte Klappe nicht nur entscheidend für die Resorption xenogener Matrixbestandteile und Synthese neuer Matrixkomponenten durch Myofibroblasten, sondern auch für einen effektiven Schutz vor Infektionen und Entzündungen durch eine konfluente Endothelzellschicht. Das eigentliche Ziel, nämlich eine längere Haltbarkeit der tissue-engineerten Klappen, könnte durch die Ausweitung der Rezellularisierungsdichte über das gesamte Segel bei verlängertem Implantationszeitraum erreicht werden (siehe oben 4.2.). Dieser Ansatz wird deshalb von unserer Forschungsgruppe weiter verfolgt.

In der Auswertung der von uns implantierten Herzklappen zeigten sich Hinweise auf entzündliche Prozesse in Verbindung mit Verkalkungen, welche sich limitierend auf die Langlebigkeit und Funktionalität der Implantate und somit auch insbesondere auf die maximal mögliche Implantationsdauer auswirken sowie die Infiltration autologer Zellen in die xenogene Matrix beeinflussen können. Infolgedessen ist es essentiell, die Ursachen für diese Entzündungsreaktionen zu identifizieren und Anpassungen vorzunehmen, um sie in Zukunft abzuschwächen oder zu unterbinden. Die histologische Analyse der Herzklappen zeigte, dass bei der Dezellularisierung mittels Trypsin/EDTA residuelle xenogene Zellen und Fremdproteine, vor allem im Bereich der Nahtstellen und der Segelbasis, zurückbleiben, die als Ursache von Entzündungsprozessen und korrespondierenden Verkalkungen angesehen werden müssen. Aufgrund dieser Erkenntnis wird eine Verbesserung des Dezellularisierungsverfahrens durch Änderung der Abfolge einzelner Arbeitsschritte in unserer Arbeitsgruppe erprobt. Der Verbleib residueller xenogener Zellen im Bereich der Nahtstellen kann zum Beispiel dadurch verhindert werden, dass die Dezellularisierung vor dem Einnähen der Klappe in den Stent erfolgt. Des Weiteren stellt die Verwendung neuer Dezellularisierungsmethoden zur Herstellung zell- und proteinfreier Matrices, wie z.B. SDS/SD, einen zusätzlichen Ansatz dar, eine optimierte Grundmatrix für die Besiedlung bereitzustellen.

In dieser Arbeit konnten gehäuft Zellansammlungen (CD31<sup>+</sup>-Zellen), Fibrinansammlungen und Verkalkungen innerhalb der explantierten Klappen nachgewiesen werden, so dass der Rückschluss auf Entzündungsprozesse – die auch in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe beobachtet und charakterisiert wurden (z.B. Olivier [55]) – gezogen werden kann. Solche entzündlichen Vorgänge sind, wie oben ausgeführt, neben einer unzureichenden Dezellulierung auch auf eine gestörte Endothelzellfunktion zurückzuführen. Eine mögliche Ursache hierfür dürfte die von Boldt et al. nachgewiesene Mischpopulation der Endothelzellen zur Besiedlung der Klappen darstellen. Durch weitere Untersuchungen, z.B. des Zellgewinnungsverfahrens, sollte geklärt werden, was für den Nachweis von glatten Muskelzellen in der Endothelzellfraktion ursächlich sein könnte.

Der Ansatz unserer Arbeitsgruppe, CD133<sup>+</sup>-Zellen mit Stammzellpotential zur Besiedlung zu verwenden, hat im Vergleich mit autologen Endothelzellen und Myofibroblasten erfolgsversprechende Ergebnisse gezeigt und sollte in weiteren Studien verfolgt werden.

Die Zukunft des Tissue Engineering wird sicherlich in der Verwendung weiterer alternativer Zellen mit Stammzellpotential liegen. Von Vorteil sind hierbei die einfachere Gewinnung, die Differenzierungsmöglichkeiten hin zu verschiedenen Zelltypen und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Self-Renewal). Der Fokus der Forschung richtet sich vor allem auf mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark.

## 5. Zusammenfassung

Für den Ersatz einer Pulmonalklappe sind verschiedene Prothesen und Implantationsverfahren in klinischer Verwendung, jedoch weisen die verfügbaren Klappenmodelle nur eine bedingte Biokompatibilität und Haltbarkeit auf. Die Fortschritte in den Bereichen der minimal-invasiven Kathetertechniken und des Tissue Engineerings ermöglichen neue Wege in der Herstellung und Platzierung von Herzklappenprothesen. Ziel dieser Arbeit ist die histologische Evaluation des Dezellularisierungsprozesses, der Zellviabilität und Verteilung autologer Endothelzellen und Myofibroblasten sowie des Auftretens von Verkalkungen beim perkutanen Pulmonalklappenersatz mit tissue-engineerten Herzklappen.

Zur *in vitro*-Besiedelung wurden autologe Endothelzellen und Myofibroblasten aus der A. carotis von Schafen gewonnen, auf zuvor mittels Trypsin/EDTA-Lösung dezellularisierte porcine Pulmonalklappen besiedelt und kultiviert. Fünf tissue-engineerte Klappen wurden für einen Beobachtungszeitraum von einem Monat in Schafe implantiert, weitere fünf, nicht-implantierte tissue-engineerte Klappen dienten als Vergleichsgruppe bei der sich anschließenden histologischen und immunhistochemischen Analyse.

Die Ergebnisse zeigten in beiden Gruppen den Verbleib von residuellen xenogenen Zellen sowie Strukturproteinen, die für die nachgewiesenen Entzündungsprozesse und Verkalkungen in der Implantationsgruppe ursächlich sind; somit konnte letztlich aufgrund eines unvollständigen Dezellularisierungsverfahrens keine azelluläre Matrix hergestellt werden. Eine Rebesiedlung mit autologen Zellen konnte in beiden Vergleichsgruppen nachgewiesen werden. In der Implantationsgruppe zeigte sich zudem eine erfolgreiche *in vivo*-Vermehrung, die Ausbildung eines Zellverbandes sowie eine Infiltration von Myofibroblasten in das porcine Grundgerüst. Allerdings war die Rebesiedlung der Klappen nicht flächendeckend ausgeprägt, so dass weitere Studien zur optimalen Ansiedlung autologer Zellverbände erforderlich sind. Neben einer Optimierung des Dezellularisierungsverfahrens erscheint der Einsatz alternativer spezifischer Zellsorten wie z.B. Stammzellen zur Herstellung einer tissue-engineerten Herzklappe erfolgversprechend.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Schünke, M., *Prometheus-Lernatlas der Anatomie: Innere Organe; 118 Tabellen*. Vol. 2. 2009: Georg Thieme Verlag.
2. Hick, C. and A. Hick, *Intensivkurs Physiologie*. 2006: Urban & Fischer.
3. Thieme, G., *care Pflege*. 2015, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
4. Misfeld, M. and H.H. Sievers, *Heart valve macro- and microstructure*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007. **362**(1484): p. 1421-36.
5. Vesely, I., *The role of elastin in aortic valve mechanics*. *J Biomech*, 1998. **31**(2): p. 115-23.
6. Missirlis, Y.F. and C.D. Armeniades, *Ultrastructure of the human aortic valve*. *Acta Anat (Basel)*, 1977. **98**(2): p. 199-205.
7. Filip, D.A., A. Radu, and M. Simionescu, *Interstitial cells of the heart valves possess characteristics similar to smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1986. **59**(3): p. 310-20.
8. Rippel, R.A., H. Ghanbari, and A.M. Seifalian, *Tissue-engineered heart valve: future of cardiac surgery*. *World journal of surgery*, 2012. **36**(7): p. 1581-1591.
9. Henne-Bruns, D., et al., *Duale Reihe Chirurgie*. Chirurgie. Stuttgart: Thieme, 2003: p. 488.
10. Mad, P., et al., *HASH (Oxad7d8f4)*. 2008.
11. Lindinger, A., G. Schwedler, and H. Hense, *Prevalence of congenital heart defects in newborns in Germany: Results of the first registration year of the PAN Study (July 2006 to June 2007)*. *Klinische Padiatrie*, 2010. **222**(5): p. 321-326.
12. Babu-Narayan, S.V., et al., *Ventricular fibrosis suggested by cardiovascular magnetic resonance in adults with repaired tetralogy of fallot and its relationship to adverse markers of clinical outcome*. *Circulation*, 2006. **113**(3): p. 405-13.
13. Wessel, H.U. and M.H. Paul, *Exercise studies in tetralogy of Fallot: a review*. *Pediatr Cardiol*, 1999. **20**(1): p. 39-47; discussion 48.
14. Gatzoulis, M.A., et al., *Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot: a multicentre study*. *Lancet*, 2000. **356**(9234): p. 975-81.
15. Davlouros, P.A., et al., *Right ventricular function in adults with repaired tetralogy of Fallot assessed with cardiovascular magnetic resonance imaging: detrimental role of right ventricular outflow aneurysms or akinesia and adverse right-to-left ventricular interaction*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **40**(11): p. 2044-52.
16. Davlouros, P.A., et al., *Timing and type of surgery for severe pulmonary regurgitation after repair of tetralogy of Fallot*. *Int J Cardiol*, 2004. **97 Suppl 1**: p. 91-101.
17. Latus, H., et al., *Beneficial effects of residual right ventricular outflow tract obstruction on right ventricular volume and function in patients after repair of tetralogy of Fallot*. *Pediatr Cardiol*, 2013. **34**(2): p. 424-30.
18. Singh, G.K., et al., *Right ventricular function and exercise performance late after primary repair of tetralogy of Fallot with the transannular patch in infancy*. *Am J Cardiol*, 1998. **81**(11): p. 1378-82.
19. Steiner, M.B., et al., *Timing of complete repair of non-ductal-dependent tetralogy of Fallot and short-term postoperative outcomes, a multicenter analysis*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014. **147**(4): p. 1299-305.

20. Tamesberger, M.I., et al., *Early primary repair of tetralogy of fallot in neonates and infants less than four months of age*. Ann Thorac Surg, 2008. **86**(6): p. 1928-35.
21. Warnes, C.A., et al., *Task force 1: the changing profile of congenital heart disease in adult life*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(5): p. 1170-5.
22. Hayes, C.J., et al., *Second natural history study of congenital heart defects. Results of treatment of patients with pulmonary valvar stenosis*. Circulation, 1993. **87**(2 Suppl): p. I28-37.
23. Murphy, J.G., et al., *Long-term outcome in patients undergoing surgical repair of tetralogy of Fallot*. N Engl J Med, 1993. **329**(9): p. 593-9.
24. Gatzoulis, M.A., et al., *Right and left ventricular systolic function late after repair of tetralogy of Fallot*. Am J Cardiol, 2000. **86**(12): p. 1352-7.
25. Rajani, B., R.B. Mee, and N.B. Ratliff, *Evidence for rejection of homograft cardiac valves in infants*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998. **115**(1): p. 111-7.
26. Christenson, J.T., et al., *Homografts and xenografts for right ventricular outflow tract reconstruction: long-term results*. Ann Thorac Surg, 2010. **90**(4): p. 1287-93.
27. Meyns, B., et al., *The Contegra conduit in the right ventricular outflow tract induces supra-valvular stenosis*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **128**(6): p. 834-40.
28. Tiete, A.R., et al., *Right ventricular outflow tract reconstruction with the Contegra bovine jugular vein conduit: a word of caution*. Ann Thorac Surg, 2004. **77**(6): p. 2151-6.
29. Vohra, H.A., et al., *Midterm evaluation of biological prosthetic valves in the pulmonary position of grown-up patients*. Thorac Cardiovasc Surg, 2012. **60**(3): p. 205-9.
30. Human, P. and P. Zilla, *Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure*. Ann Thorac Surg, 2001. **71**(5 Suppl): p. S385-8.
31. Shin, H.J., et al., *Outcomes of mechanical valves in the pulmonic position in patients with congenital heart disease over a 20-year period*. Ann Thorac Surg, 2013. **95**(4): p. 1367-71.
32. Vida, V.L., et al., *Risk of surgery for congenital heart disease in the adult: a multicentered European study*. Ann Thorac Surg, 2007. **83**(1): p. 161-8.
33. O'Byrne, M.L., et al., *Cost comparison of Transcatheter and Operative Pulmonary Valve Replacement (from the Pediatric Health Information Systems Database)*. Am J Cardiol, 2016. **117**(1): p. 121-6.
34. Bonhoeffer, P., et al., *Percutaneous replacement of pulmonary valve in a right-ventricle to pulmonary-artery prosthetic conduit with valve dysfunction*. Lancet, 2000. **356**(9239): p. 1403-5.
35. Butera, G., et al., *Melody transcatheter pulmonary valve implantation. Results from the registry of the Italian Society of Pediatric Cardiology*. Catheter Cardiovasc Interv, 2013. **81**(2): p. 310-6.
36. McElhinney, D.B., et al., *Short- and medium-term outcomes after transcatheter pulmonary valve placement in the expanded multicenter US melody valve trial*. Circulation, 2010. **122**(5): p. 507-16.
37. Boudjemline, Y., et al., *Percutaneous pulmonary valve replacement in a large right ventricular outflow tract: an experimental study*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(6): p. 1082-7.

38. Wilson, W.M., et al., *Transcatheter Pulmonary Valve Replacement With the Edwards Sapien System: The Toronto Experience*. JACC Cardiovasc Interv, 2015. **8**(14): p. 1819-27.
39. Khambadkone, S., J. Nordmeyer, and P. Bonhoeffer, *Percutaneous implantation of the pulmonary and aortic valves: indications and limitations*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2007. **8**(1): p. 57-61.
40. Roberts, W.C., *Choosing a substitute cardiac valve: type, size, surgeon*. Am J Cardiol, 1976. **38**(5): p. 633-44.
41. Hopkins, R.A., et al., *Decellularization reduces calcification while improving both durability and 1-year functional results of pulmonary homograft valves in juvenile sheep*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(4): p. 907-13, 913e1-4.
42. Leyh, R., et al., *[A xenogeneic acellularized matrix for heart valve tissue engineering: in vivo study in a sheep model]*. Z Kardiol, 2003. **92**(11): p. 938-46.
43. Mendelson, K. and F.J. Schoen, *Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges*. Ann Biomed Eng, 2006. **34**(12): p. 1799-819.
44. Cebotari, S., et al., *Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I132-7.
45. Goldstein, S., et al., *Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft*. Ann Thorac Surg, 2000. **70**(6): p. 1962-9.
46. Butcher, J.T. and R.M. Nerem, *Porcine aortic valve interstitial cells in three-dimensional culture: comparison of phenotype with aortic smooth muscle cells*. J Heart Valve Dis, 2004. **13**(3): p. 478-85; discussion 485-6.
47. Ramaswamy, S., et al., *The role of organ level conditioning on the promotion of engineered heart valve tissue development in-vitro using mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2010. **31**(6): p. 1114-25.
48. Sales, V.L., et al., *Endothelial progenitor cells as a sole source for ex vivo seeding of tissue-engineered heart valves*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(1): p. 257-67.
49. Boldt, J., et al., *Percutaneous tissue-engineered pulmonary valved stent implantation: comparison of bone marrow-derived CD133+ cells and cells obtained from carotid artery*. Tissue Eng Part C Methods, 2013. **19**(5): p. 363-74.
50. Martinez, C., et al., *Periodontal ligament cells cultured under steady-flow environments demonstrate potential for use in heart valve tissue engineering*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**(3-4): p. 458-66.
51. Lichtenberg, A., et al., *Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I559-65.
52. Hulsmann, J., et al., *A novel customizable modular bioreactor system for whole-heart cultivation under controlled 3D biomechanical stimulation*. J Artif Organs, 2013. **16**(3): p. 294-304.
53. Lichtenberg, A., et al., *Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves*. J Heart Valve Dis, 2006. **15**(2): p. 287-93; discussion 293-4.
54. Mol, A., et al., *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.
55. Olivier, A.C., *Perkutaner Herzklappenersatz mit autologen Tissue-Engineerten klappentragenden-Stents: Charakterisierung von entzündlichen und extrazellulären Veränderungen*; Diss. med. CAU Kiel, Christian-Albrechts-Universität, Editor. 2013: Kiel.

56. Bethge, J., *Perkutaner Pulmonalklappenersatz und Tissue Engineering: Die Herstellung und Charakterisierung selbstexpandierbarer klappentragender Stents auf der Basis eines dezellularisierten Klappengerüstes*; Diss. med. CAU Kiel, Christian-Albrechts-Universität, Editor. 2009: Kiel
57. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. *Biomaterials*, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
58. Bekkers, J.A., et al., *Re-operations for aortic allograft root failure: experience from a 21-year single-center prospective follow-up study*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011. **40**(1): p. 35-42.
59. da Costa, F.D., et al., *Immunological and echocardiographic evaluation of decellularized versus cryopreserved allografts during the Ross operation*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2005. **27**(4): p. 572-8.
60. Hawkins, J.A., et al., *Class I and class II anti-HLA antibodies after implantation of cryopreserved allograft material in pediatric patients*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000. **119**(2): p. 324-30.
61. Ruffer, A., et al., *Early failure of xenogenous de-cellularised pulmonary valve conduits--a word of caution!* *Eur J Cardiothorac Surg*, 2010. **38**(1): p. 78-85.
62. Simon, P., et al., *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003. **23**(6): p. 1002-6; discussion 1006.
63. Rieder, E., et al., *Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells*. *Circulation*, 2005. **111**(21): p. 2792-7.
64. Steinhoff, G., et al., *Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue*. *Circulation*, 2000. **102**(19 Suppl 3): p. III50-5.
65. Rieder, E., et al., *Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004. **127**(2): p. 399-405.
66. Kasimir, M.T., et al., *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves*. *Int J Artif Organs*, 2003. **26**(5): p. 421-7.
67. Meyer, S.R., et al., *Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005. **130**(2): p. 469-76.
68. Meyer, S.R., et al., *Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat*. *J Biomed Mater Res A*, 2006. **79**(2): p. 254-62.
69. Grauss, R.W., et al., *Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2005. **27**(4): p. 566-71.
70. Tudorache, I., et al., *Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves*. *J Heart Valve Dis*, 2007. **16**(5): p. 567-73; discussion 574.
71. Schneider, P.J. and J.D. Deck, *Tissue and cell renewal in the natural aortic valve of rats: an autoradiographic study*. *Cardiovasc Res*, 1981. **15**(4): p. 181-9.
72. Messier, R.H., Jr., et al., *Dual structural and functional phenotypes of the porcine aortic valve interstitial population: characteristics of the leaflet myofibroblast*. *J Surg Res*, 1994. **57**(1): p. 1-21.
73. Desmouliere, A., *Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis*. *Cell Biol Int*, 1995. **19**(5): p. 471-6.



74. Gulbins, H., et al., *Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **125**(3): p. 592-601.
75. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
76. Kasimir, M.T., et al., *The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation*. Thromb Haemost, 2005. **94**(3): p. 562-7.
77. Cebotari, S., et al., *Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix*. Circulation, 2002. **106**(12 Suppl 1): p. I63-I68.
78. Andrews, R.K. and M.C. Berndt, *Platelet physiology and thrombosis*. Thromb Res, 2004. **114**(5-6): p. 447-53.
79. MacGregor, D.C., et al., *Improved thromboresistance of mechanical heart valves with endothelialization of porous metal surfaces*. Surg Forum, 1979. **30**: p. 239-41.
80. Bengtsson, L.A. and A.N. Haegerstrand, *Endothelialization of mechanical heart valves in vitro with cultured adult human cells*. J Heart Valve Dis, 1993. **2**(3): p. 352-6.
81. Fischlein, T., et al., *Endothelialization of aldehyde-fixed cardiac valve bioprostheses*. Transplant Proc, 1992. **24**(6): p. 2988.
82. Quinn, R.W., et al., *Performance and morphology of decellularized pulmonary valves implanted in juvenile sheep*. Ann Thorac Surg, 2011. **92**(1): p. 131-7.
83. Honge, J.L., et al., *Recellularization of aortic valves in pigs*. Eur J Cardiothorac Surg, 2011. **39**(6): p. 829-34.
84. Song, J.W. and L.L. Munn, *Fluid forces control endothelial sprouting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(37): p. 15342-7.
85. Emmert, M.Y., et al., *Transcatheter tissue engineered heart valves*. Expert Review of Medical Devices, 2014. **11**(1): p. 15-21.
86. Schnell, A.M., et al., *Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts*. Thorac Cardiovasc Surg, 2001. **49**(4): p. 221-5.
87. Butcher, J.T., et al., *Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(8): p. 1429-34.
88. Sodian, R., et al., *Use of human umbilical cord blood-derived progenitor cells for tissue-engineered heart valves*. Ann Thorac Surg, 2010. **89**(3): p. 819-28.
89. Schmidt, D., et al., *Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I125-31.
90. Kaminski, A., et al., *Autologous valve replacement-CD133+ stem cell-plus-fibrin composite-based sprayed cell seeding for intraoperative heart valve tissue engineering*. Tissue Eng Part C Methods, 2011. **17**(3): p. 299-309.
91. Jordan, J.E., et al., *Bioengineered self-seeding heart valves*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2012. **143**(1): p. 201-8.
92. Medici, D., et al., *Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells*. Nat Med, 2010. **16**(12): p. 1400-6.
93. Muylaert, D.E., et al., *Environmental Influences on Endothelial to Mesenchymal Transition in Developing Implanted Cardiovascular Tissue-Engineered Grafts*. Tissue Eng Part B Rev, 2015.
94. Namiri, M., et al., *Engineering natural heart valves: possibilities and challenges*. J Tissue Eng Regen Med, 2016.

95. Kobayashi, N., et al., *Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells*. Exp Hematol, 2004. **32**(12): p. 1238-45.
96. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
97. Simpson, D.L., et al., *Engineering patient-specific valves using stem cells generated from skin biopsy specimens*. Ann Thorac Surg, 2014. **98**(3): p. 947-54.
98. Zehr, K.J., et al., *Aortic root replacement with a novel decellularized cryopreserved aortic homograft: postoperative immunoreactivity and early results*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. **130**(4): p. 1010-5.
99. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006. **27**(19): p. 3675-83.
100. Pusztaszeri, M.P., W. Seelentag, and F.T. Bosman, *Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues*. J Histochem Cytochem, 2006. **54**(4): p. 385-95.

## 7. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. J. Cremer, Direktor der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, für die Bereitschaft, in seiner Klinik promovieren zu können.

Für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und für die uneingeschränkte und stets freundliche Unterstützung möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Georg Lutter, Inhaber des Lehrstuhls für Experimentelle Herzchirurgie und Herzklappenersatz an der CAU Kiel, herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Irma Haben, Projektleiterin Tissue Engineering am Lehrstuhl von Herrn Prof. Lutter, die meine Ausarbeitungen sorgfältig und mit Geduld begleitet hat. Für Ihre kompetente Unterstützung sei gedankt.

In besonders guter Erinnerung wird mir die Zusammenarbeit mit allen Mitarbeitern des Herzchirurgischen Forschungslabors bleiben, insbesondere Frau Dr. rer. nat. Jessica Haupt.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die mich immer bedingungslos unterstützt hat. Diese Arbeit wäre ohne Euch nicht möglich gewesen.

---

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Originalartikel:**

- 1) Lutter G., Metzner A., Jahnke T., Bombien R., Boldt J., Iino K., Cremer J., Stock U.A. „Percutaneous tissue-engineered pulmonary valved stent implantation.“ *Ann Thorac Surg.* 2010 Jan;89(1):259-63.
- 2) Metzner A., Stock U.A., Iino K., Fischer G., Huemme T., Boldt J., Braesen JH., Bein B., Renner J., Cremer J., Lutter G. „ Percutaneous pulmonary valve replacement : autologous tissue-engineered valved stents.“ *Cardiovasc. Res.* 2010 Dec 1; 88(3):453-61. Epub 2010 Jul 1.
- 3) Boldt J., Lutter G., Pohanke J., Fischer G., Schoettler J., Cremer J., Metzner A. „ Percutaneous tissue-engineered pulmonary valved stent implantation: Comparison of bone marrow-derived CD133+-cells and cells obtained from carotid artery.“ *Tissue Eng Part C Methods.* 2013 May;19(5):363-74. Epub 2012 Dec 18.