

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

HISTOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG TISSUE ENGINEERTER  
PULMONALKLAPPENSTENTS BEI PERKUTANER IMPLANTATION  
IN BEZUG AUF DIE LAGE DES STENTS

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

vorgelegt von

DOMINIK THOMAS RICHTER

aus Hamburg

Kiel (2018)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Georg Lutter, Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Felix Braun, Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel den 22.07.2019

gez.: PD Dr. med. Tim Attmann  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meiner Frau Hilka gewidmet. Du bist mein Fels in der Brandung.

Anteile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Postervortrag

Richter D., Pokorny S., Haben I., Metzner A., Haupt J., Lutter G. Minimally invasive percutaneous transluminal replacement of the pulmonary valve: histological effects of non-orthotopic placement of the valve carrying stent. Annual Meeting 2017 of the International Society For Minimally Invasive Cardiothoracic Surgery (ISMICS), Rom 07.-10. Juni 2017

# Inhalt

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Anatomie des Herzens	1
1.1.1 Makroskopie	1
1.1.2 Mikroskopie der Pulmonalklappensegel	2
1.2 Herz-Kreislaufkrankungen	3
1.2.1 Pathologien der Herzklappen	3
1.2.2 Diagnostik von Herzklappenerkrankungen	4
1.2.3 Therapieoptionen	4
1.3 Tissue Engineering	5
1.4 Ziel der Forschung	5
1.4.1 Orthotope und nicht-orthotope Platzierung des Klappenstents	5
1.4.2 Ziel dieser Arbeit	6
1.4.3 Studienparameter	7
<b>Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1 Herstellung der Klappen und Stents	8
2.1.1 Präparation des Klappengerüsts	8
2.1.2 Einnähen des Klappengerüsts in den Nitinol-Stent	9
2.1.3 Dezellularisierung	9
2.1.4 Zellgewinnung der CD133 positiven Zellen/Besiedlung/Bioreaktor	9
2.1.5 Zellgewinnung A. carotis/Besiedlung/Bioreaktor	10
2.2 Implantation	11
2.2.1 Vorbereitung und Anästhesie	11
2.2.2 Punktion und Kontrastmitteldarstellung	12
2.2.3 Klappenstentplatzierung und Expansion	12
2.2.4 Lagekontrolle und Beendigung des Eingriffs	14
2.2.5 Nachsorge	15
2.3 Explantation	15
2.3.1 Vorbereitung und Anästhesie	15
2.3.2 Punktion und Kontrastmitteldarstellung	15
2.3.3 Euthanasie	15
2.3.4 Explantation und Beendigung des Eingriffs	15
2.4 Resektion der Herzklappen und Einbettung	17
2.4.1 Präparation der Herzkammer und Resektion der Herzklappe	17
2.4.2 Definition der orthotopen Platzierung	18
2.4.3 Klassifikation der nicht-orthotopen Platzierung	19
2.5 Histologische Untersuchungen	22
2.5.1 Durchführung der Färbungen	23

2.5.1.1	Anfertigung der Schnitte	23
2.5.1.2	Pentachrom Färbung nach Movat	24
2.5.1.3	Van Gieson Färbung	24
2.5.1.4	Immunhistochemie	24
2.5.2	Graduierung und Auswertung	25
2.5.2.1	Schichtung	25
2.5.2.2	Hyperthrophie	26
2.5.2.3	Kollagen I und III	26
2.5.2.4	Zellpopulation	26
<b>Ergebnisse</b>		27
3.1	Fluoroskopie und Stentposition	27
3.2	Drücke im rechten Vorhof und Ventrikel	32
3.3	Histologie	33
3.3.1	Schichtung der Herzklappen	33
3.3.2	Hypertrophie/Hyperplasie	35
3.3.3	Immunhistochemische Färbung Kollagen I	37
3.3.4	Immunhistochemische Färbung Kollagen III	39
3.3.5	Zellpopulation	42
<b>Diskussion</b>		44
4.1	Tissue Engineering - Stand der Dinge	44
4.2	Die Platzierung der Klappenstents	47
4.3	Histologische Untersuchungen	47
4.3.1	Schichtung der Herzklappen	47
4.3.2	Gefäßwandhyperthrophie	48
4.3.3	Kollagengehalt der Herzklappen	48
4.3.4	Zellpopulation der Herzklappen	48
4.4	Limitationen der Studie	49
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	49
<b>Zusammenfassung</b>		51
Einleitung		51
Material und Methoden		51
Ergebnisse		51
Schlussfolgerung		51
<b>Literatur</b>		52
<b>Materialliste</b>		59
Geräte		59
Reagenzien		60
Verbrauchsmaterial		63
<b>Danksagung</b>		64

## **Abkürzungsverzeichnis**

<b>A.</b>	<b>Arteria</b>
<b>Abb.</b>	<b>Abbildung</b>
<b>bzw.</b>	<b>beziehungsweise</b>
<b>°C</b>	<b>Grad Celsius</b>
<b>ca.</b>	<b>circa</b>
<b>CD</b>	<b>Cluster of Differentiation</b>
<b>cm</b>	<b>Zentimeter</b>
<b>DAB+</b>	<b>3,3' Diaminobenzidin</b>
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</b>
<b>Dr.</b>	<b>Doktor</b>
<b>EKG</b>	<b>Elektrokardiogramm</b>
<b>g</b>	<b>Gramm</b>
<b>GF</b>	<b>Gesichtsfeld</b>
<b>Hz</b>	<b>Hertz</b>
<b>i.v.</b>	<b>intravenös</b>
<b>kg</b>	<b>Kilogramm</b>
<b>l</b>	<b>Liter</b>
<b>med.</b>	<b>medicinae</b>
<b>min</b>	<b>Minute</b>
<b>ml</b>	<b>Milliliter</b>
<b>mmHG</b>	<b>Millimeter Quecksilbersäule</b>
<b>NaCl</b>	<b>Natrium-Chlorid</b>
<b>NO</b>	<b>nicht-orthotop</b>
<b>NOSP</b>	<b>Non Orthotopic Stent Position</b>
<b>O</b>	<b>orthotop</b>
<b>o.g.</b>	<b>oben genannt</b>
<b>OP</b>	<b>Operation</b>
<b>P</b>	<b>Druck</b>
<b>PBS</b>	<b>Phosphate buffered saline</b>
<b>PD</b>	<b>Privatdozent</b>
<b>pH</b>	<b>pH-Wert</b>
<b>RAP</b>	<b>right atrial pressure</b>

<b>Prof.</b>	<b>Professor</b>
<b>RVP</b>	<b>right ventricular pressure</b>
<b>rer. nat.</b>	<b>rerum naturalium</b>
<b>SMC</b>	<b>Smooth muscle cells</b>
<b>SOP</b>	<b>Standard Operating Procedures</b>
<b>s.u.</b>	<b>siehe unten</b>
<b>Tab.</b>	<b>Tabelle</b>
<b>TE</b>	<b>Tissue Engineering</b>
<b>µg</b>	<b>Mikrogramm</b>
<b>V.</b>	<b>Vena</b>
<b>z.B.</b>	<b>zum Beispiel</b>

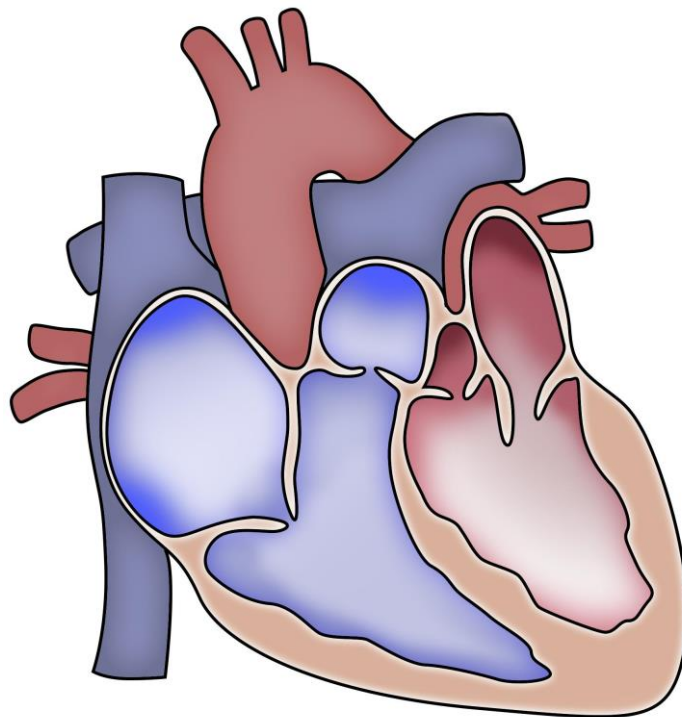


# Einleitung

## 1.1 Anatomie des Herzens

### 1.1.1 Makroskopie

Das menschliche Herz besitzt als muskuläres Hohlorgan vier Herzklappen, welche den kontrollierten Blutfluss in der Systole und Diastole garantieren. Die Vorhöfe sind von den Kammern über Segelklappen getrennt, im rechten Herzen durch die dreisehlige Trikuspidalklappe, im linken Herzen durch die zweisehlige Mitralklappe. Die Kammern leiten das Blut jeweils über ein kräftiges Gefäß vom Herzen in die Lunge bzw. in die Peripherie. Zwischen rechter Kammer und Pulmonalarterie liegt die Pulmonalklappe, zwischen linker Kammer und Aorta die Aortenklappe. Da diese Klappen die Flussrichtung des Blutes maßgeblich mitbestimmen, ist eine Erkrankung der Herzklappen mit schwerwiegenden Folgen für die Funktion und Lebensdauer des Herzens verbunden und somit von hohem medizinischem Interesse.



*Abb. 1 Schematische Darstellung des menschlichen Herzens*

### **1.1.2 Mikroskopie der Pulmonalklappensegel**

Die mikroskopische Struktur der Herzklappen wurde in mehreren Studien untersucht. Die Pulmonalklappe ist sowohl ventrikelwärts als auch zur Pulmonalarterie hin von einer dünnen Schicht aus Endothel bedeckt. Dieses Endothel besteht aus valvulär endothelialen Zellen (Flanagan et al. 2003). Der Großteil des Segels besteht aus lockerem Bindegewebe sowie Kollagenfasern. Diese extrazelluläre Matrix wird von valvulär intestinalen Zellen gebildet (Flanagan et al. 2003, Filip et al. 1986). Die Segel sind frei von Gefäßen. Eine 5-Schichtung der Herzklappen wird postuliert, es wird eine lamina ventricularis, radialis, spongiosa, fibrosa und arterialis unterschieden (Gross und Kugel 1931, Misfeld et al. 2007). In manchen Publikationen werden jedoch nur drei Schichten unterschieden, die Lamina fibrosa, Lamina spongiosa und Lamina ventricularis (Combs und Yutzey 2009).

Die Lamina ventricularis stellt die Schicht unterhalb des zum Ventrikel hin gelegenen Endothels dar. Sie besteht zum Großteil aus Bindegewebe mit reichlich Elastin und enthält nur wenig Kollagenfasern. Darauf folgt die Lamina radialis, welche radial gerichtete Kollagenfasern enthält. Diese Schicht geht über in das Endokard und die darunterliegenden Schichten. Die Lamina spongiosa ist eine Schicht aus lockerem Bindegewebe und vereinzelt kollagenen Faserbündeln. Dagegen ist die Lamina fibrosa mit reichlich zirkulär angeordneten Kollagenfasern durchzogen. Diese ist mit dem Anulus der Klappe verbunden. Unter dem zur Arterie hin gelegenen Endothel liegt noch die Lamina arterialis. Diese zeichnet sich durch eine dünne Schicht aus Bindegewebe aus und lässt sich nicht immer histologisch darstellen (Gross und Kugel 1931).

Bei der Entwicklung der Herzklappe scheint Kollagen maßgeblich beteiligt zu sein (Sellaro et al. 2007). Dabei stellt Kollagen III das wichtigste Strukturelement der Klappen dar (White et al. 2010).

## **1.2 Herz-Kreislaferkrankungen**

Im Jahre 2011 waren Herzerkrankungen für 8,2 % der Krankenhausaufnahmen in Deutschland verantwortlich. Die Mortalität bei Herzerkrankungen liegt bei 257,4/100.000 Einwohner. Hierbei stellen die koronare Herzkrankheit sowie der akute Myokardinfarkt den Großteil dar, gefolgt von den erworbenen Herzklappendefekten. Die Mortalität der angeborenen Herzklappendefekt liegt bei ca. 0,6/100.000 Einwohner (Fleck 2014).

Der Großteil der angeborenen Herzfehler sind septale Defekte. Der Ventrikelseptumdefekt, Vorhofseptumdefekt und offener Ductus arteriosus botalli stellen zusammen ca. 45-55 % der angeborenen Herzklappenerkrankungen dar (Renz-Polster und Krautzig 2008).

Pathologien der Pulmonalklappe im Sinne der alleinigen Pulmonalstenose sowie als Bestandteil der Fallot-Tetralogie machen zusammen ca. 12,5 % der angeborenen Herzklappenerkrankungen aus (Renz-Polster und Krautzig 2008).

### **1.2.1 Pathologien der Herzklappen**

Bei den Erkrankungen der Herzklappen unterscheidet man nach der Ätiologie angeborene und erworbene Herzklappendefekte. Zudem teilt man die Defekte nach funktionellen Aspekten in Klappenstenosen und Insuffizienzen ein. Eine insuffizient schließende Klappe bewirkt einen Rückstrom des Blutes in das vorgeschaltete Kompartiment, sodass es hier zu einem Rückstau kommt und die effektive Auswurfmenge vermindert wird. Die stenosierte Klappe bewirkt ebenfalls eine verminderte Auswurfmenge, jedoch kommt es kompensatorisch zu einer muskulären Hypertrophie des Ventrikels bzw. zu einem Rückstau in die vorgeschalteten Kompartimente. Das rheumatische Fieber spielt bei den Erkrankungen der Herzklappen nahezu keine Rolle mehr (Soler-Soler und Galve 2000). Die histologischen Veränderungen der Klappen umfassen neben der Kalzifizierung bei Stenosen die Disorganisation der elastischen Fasern, Veränderungen der extrazellulären Matrix, großflächige Fibrosen und Lipideinlagerungen (Perrotta et al. 2011, Attmann et al. 2007). Die Veränderung der Homöostase der Zellen in den Herzklappen ist hauptverantwortlich für pathologische Veränderungen der Klappen (Wang et al. 2014). Die valvulär intestinalen Zellen sind maßgeblich an einem Remodelling der Herzklappe beteiligt (Rabkin-Aikawa et al. 2004). Gerade die Kollagenproduktion in den Klappen scheint durch Veränderungen der Umgebung beeinflusst zu werden (Merryman et al. 2006).

## 1.2.2 Diagnostik von Herzklappenerkrankungen

In der Diagnostik von Herzklappendefekten stehen die gängigen Untersuchungsmethoden der Kardiologie zur Verfügung:

- Anamnese und körperliche Untersuchung: Synkopen, mangelnde Belastbarkeit, Dyspnoe, gestaute Halsvenen
- Auskultation: systolische und diastolische Herzgeräusche
- EKG: Zeichen der Links-/ Rechtsherzhypertrophie
- Echokardiographie: Darstellung des Klappendefekts, Messung von Rückfluss und Auswurfleistung
- Angiografie

Desweiteren stehen Schnittbildgebungen mittels Computertomografie und Magnetresonanztomografie zur Darstellung des Herzens zur Verfügung (Renz-Polster und Krautzig 2008).

## 1.2.3 Therapieoptionen

Da Herzklappen kein Regenerationspotential besitzen, ist bei hämodynamisch relevanten Herzklappenerkrankungen nur der Herzklappenersatz eine sinnvolle Therapieoption (Rabkin-Aikawa et al. 2005). 1952 wurde durch Charles A. Hufnagel der erste erfolgreiche Herzklappenersatz durchgeführt (Cohn 2012). Der gängigste Zugangsweg ist die offene Operation an der Herzlungenmaschine über eine Sternotomie. Als Klappenersatz dienen mechanische Klappen sowie biologische Klappen. Bei letzteren handelt es sich um Xenografts von Schweinen oder rekonstruierte Klappen aus Rinderperikard (Bruch et al. 2008). In den Jahren 2000 und 2002 wurden erstmals Pulmonal- und Aortenklappen minimalinvasiv ersetzt (Bonhoeffer et al. 2000, Cribier et al. 2002). Die Zugang erfolgte über die Femoralgefäße. Mittlerweile gibt es Studien mit erfolgversprechenden Ergebnissen über mehrere Jahre (Borik et al. 2015). Des Weiteren steht die Minithorakotomie mit Zugang über die Herzspitze als minimalinvasives Verfahren zur Verfügung (Bruch et al. 2008). Die momentan verfügbaren Herzklappen - sowohl mechanisch als auch biologisch - haben spezifische Probleme, die ihren Einsatz limitieren. Hierzu zählen die Notwendigkeit der Antikoagulation, das Risiko einer Infektion sowie die Degeneration (Schenke-Layland et al. 2004). Besonders bei den Patienten, die im Kindesalter operiert wurden, wird aufgrund dessen eine Revisionsoperation notwendig. Diese wird meistens sehr aufwändig und birgt mehr Risiken (Frigiola et al. 2009).

## **1.3 Tissue Engineering**

Mit dem Begriff Tissue Engineering wird ein Verfahren zur Herstellung von Gewebe bezeichnet, bei dem Zellen aus dem Körper des Patienten verwendet werden. Diese körpereigenen Gewebe können dann auf zellfreie Rohlinge so aufgebracht werden, dass ein höchst verträglicher Organersatz entsteht (Jana et al. 2016, Barron et al. 2003).

Im Bereich des Herzklappenersatzes könnte eine solche Klappe die momentanen Probleme der biologischen und mechanischen Klappen überwinden (Stock et al. 2002). Denn diese Probleme wirken sich in einer erhöhten Morbidität und Letalität aus, sodass hier noch Bedarf zur Verbesserung der Methodik besteht (Mirensky et al. 2010).

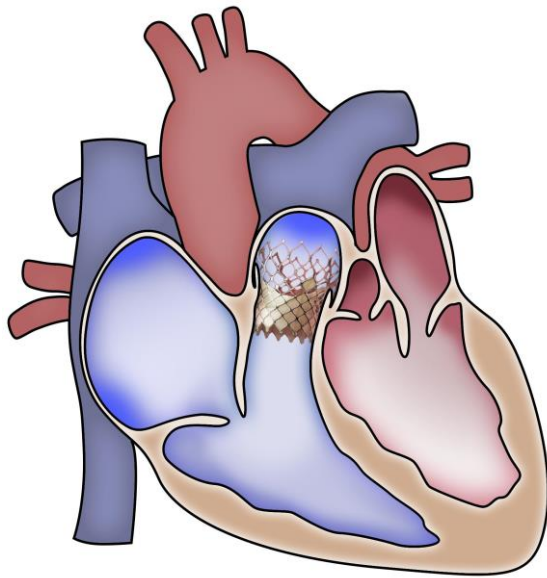
## **1.4 Ziel der Forschung**

Unter idealen Bedingungen würde der Ersatz einer Herzklappe mit minimalem perioperativem Risiko verbunden sein, keine erneuten Operationen sowie keine Dauermedikation mit Antikoagulantien notwendig werden. Ziel der Forschungsgruppe von Prof. Dr. med. Georg Lutter ist unter anderem der Ersatz der Pulmonalklappe in einem minimalinvasiven Eingriff, der eine erneute Operation durch eine möglichst langlebige sowie höchst verträgliche Klappe lange hinauszögert oder ganz erübrigt (Lutter et al. 2010, Metzner et al. 2010, Attmann et al. 2005). Um dies zu erreichen, werden Tissue engierte Klappen mit CD133 positiven Zellen aus dem Knochenmark sowie Endothelzellen und SMC aus der A. carotis verwendet (Boldt et al. 2013).

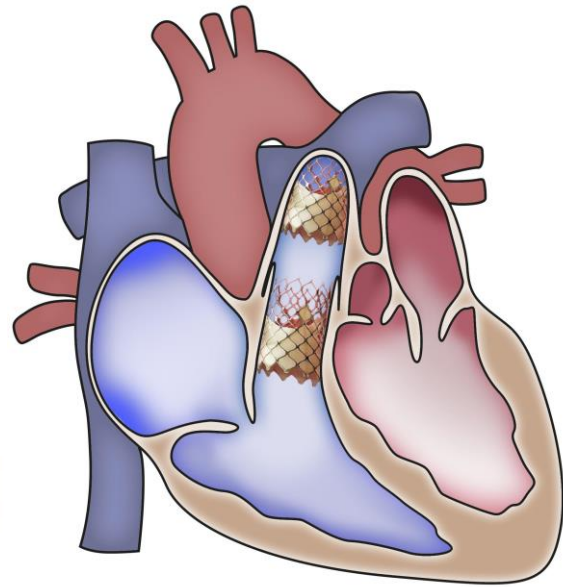
### **1.4.1 Orthotope und nicht-orthotope Platzierung des Klappenstents**

Die Implantation der Klappen erfolgt derzeit über einen Katheter, in welchem der Klappenstent zusammengefaltet eingebracht wird, um dann an der gewünschten Position expandiert zu werden (Lutter et al. 2010). Nach der Expansion des Klappenstents ist eine Lagekorrektur nicht mehr möglich, da es hier zu einer möglichen Perforation oder Ruptur der Pulmonalarterie oder des Ventrikels mit letalem Ausgang kommen kann. Da die Expansion auch unter sorgfältiger fluoroskopischer Kontrolle und viel Feingefühl trotzdem zu einer nicht mehr korrigierbaren Fehlplatzierung des Klappenstents führen kann, sind die Auswirkungen auf die Klappenstents und das umliegende Gewebe und damit auf die Langlebigkeit und Verträglichkeit der Klappe in dieser Arbeit von Interesse. Eine Fehlplatzierung bedeutet entweder ein zu weites Hineinragen des Klappenstents in den

Ventrikel, also eine zu proximale Position, oder eine zu distale Position bis an die Bifurkation der Pulmonalarterie. Nachfolgend werden die korrekt platzierten Klappenstents als orthotop bezeichnet, diejenigen, die fehlplatziert wurden, als nicht-orthotop. Die definitive Einteilung erfolgte anhand der Messungen an den Explantaten.



*Abb. 2 Orthotop platzierter Klappenstent*



*Abb. 3 Nicht-orthotop platzierte Klappenstents*

### **1.4.2 Ziel dieser Arbeit**

Diese Arbeit hat sich mit den histologischen Auswirkungen einer Fehlplatzierung des klappentragenden Klappenstents beschäftigt. Im Fokus standen die strukturellen Veränderungen der Klappe selbst sowie am umliegenden Gefäßabschnitt. Um diese Fragen beantworten zu können, wurden immunhistochemische Untersuchungen von Kollagen I und III durchgeführt, da diese die wichtigsten strukturellen Proteine von Herzklappen darstellen (White et al. 2010).

Die Pulmonalarterie reagiert auf dauerhafte Erhöhungen des pulmonalarteriellen Drucks. Diese lassen sich histologisch nachweisen und ähneln den Reaktionen der Aorta auf einen erhöhten systemisch-arteriellen Druck mit einer Hypertrophie der Tunica media, einem Umbau der elastischen Fasern mit der Folge einer geringeren Elastizität (Heath 1973). Zudem führen erhöhte Drücke zu einer endothelialen Hyperplasie (Kapanci 1965). Daher wurden ebenfalls histologische Untersuchungen der Pulmonalarterie durch Färbungen mit Movat-Pentachrom angefertigt.

Zudem wurde ein System zur Klassifizierung der Fehlplatzierung der Pulmonalklappenstents erstellt. In diesem Zusammenhang stellten sich folgende Fragen:

- Wirkt sich die Platzierung auf die grundlegende Struktur der Herzklappe aus?
- Hat eine unterschiedliche Platzierung Einfluss auf die Kollagen I/III Produktion?
- Wie reagiert der umliegende Gefäßabschnitt auf eine Fehlplatzierung des Klappenstents?
- Verändert sich die Anzahl der vorhanden Zellen in einer Herzklappe bei unterschiedlicher Platzierung des Klappenstents?
- Kann eine Fehlplatzierung des Klappenstents sinnvoll klassifiziert werden?

### **1.4.3 Studienparameter**

Als Versuchstiere dienten Schafe, da sich die Herzarchitektur und die Drücke in den einzelnen Kompartimenten gut auf den Menschen übertragen lassen (Ali et al. 1996). Die damaligen Versuchsreihen erzielten Verweildauern von 95 bis 133 Tagen. Es erfolgte ein Vergleich zwischen jeweils 5 Versuchsreihen mit orthotoper und nicht-orthotoper Platzierung. Da auch andere Projekte mit Schafen in der Forschungsgruppe durchgeführt wurden, wurden die Versuchstiere mit TE für Tissue Engineering und der dazugehörigen laufenden Versuchszahl gekennzeichnet. Für die histologische Untersuchung habe ich Färbungen der Klappen nach Movat Pentachrom, van Giesson, sowie immunhistochemische Färbungen zur Darstellung von Kollagen I und Kollagen III durchgeführt. Zudem wurden von mir Färbungen der Pulmonalarterie im Bereich der Stentbette, ebenfalls mit Movat Pentachrom, durchgeführt.

# **Material und Methoden**

Die hier aufgeführten Verfahrensweisen sind Bestandteil der Standard Operating Procedures (SOP) für die Gewinnung, Implantation, Explantation und Untersuchung Tissue engineerter Herzklappen am Lehrstuhl für Experimentelle Herzchirurgie und Herzklappenersatz, Kiel, Leitung Prof. Dr. med. Georg Lutter. Sie sind im Rahmen multimodaler Forschungsergebnisse entstanden unter Verwendung der Grundlagen histologischer Färbemethodiken (Romeis et al. 2010). Die Herstellung der Nitinolstents sowie die Einbettung der Herzklappen, die makroskopische Beurteilung sowie Präparation und Einbettung der Herzklappen erfolgte durch die Assistenten des Laboratoriums der Experimentellen Herzchirurgie und der Herzklappenersatz erfolgte durch Prof. Dr. med. Georg Lutter in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Gunther Fischer und PD Dr. med. Jan Hinnerk Hansen aus der Kinderkardiologie.

Diese Arbeit beschäftigt sich intensiv mit der Makroskopie und Mikroskopie von Tissue engineerter Klappenstents im pulmonalen Anulus und Ausflusstrakt. Hingegen war die Herstellung der Tissue engineerter Klappen, der Nitinolstents und deren Implantation nicht wesentlicher Teil meiner Arbeit. Diese wurden von mir lediglich intensiv unterstützt. Daher werde ich diese hier deskriptiv beschreiben und nicht die dazu benötigten Geräte und Materialien beschreiben.

## **2.1 Herstellung der Klappen und Stents**

### **2.1.1 Präparation des Klappengerüsts**

Als Grundgerüst für die Herstellung der Klappen dienten Schweineherzklappen, welche von einem lokalen Schlachter bezogen wurden. Hierfür musste zunächst die Pulmonalarterie sowie der rechte Ventrikel mit der Präparierschere eröffnet werden. Die Klappe wurde en bloc mit ventrikulärer Muskulatur und Pulmonalarterie reseziert, nach proximal ca. 2 cm, nach distal ca. 4 cm. Die Segel wurden von überschüssigem Fett befreit und anschließend in Betaisodona-Lösungen und sterilen 0,9 % NaCl-Bädern gewaschen. Die Waschungen mit 0,9 % NaCl wurden häufig wiederholt, um ein Austrocknen des zarten Gewebes zu vermeiden. Von distal wurde ein U-förmiges Stück im Bereich jeden Segels reseziert, sodass im Bereich des Isthmus der Segel ein 1,5 cm breiter Steg entstand. Nachfolgend wurden die muskulären Schichten mit Pinzette, Skalpell und mikrochirurgischer Federschere abpräpariert, sodass lediglich die Segel in einem Bett aus Endothel bestehen blieb.



### **2.1.2 Einnähen des Klappengerüsts in den Nitinol-Stent**

Unmittelbar nach der Präparation erfolgte die Einnähung des Klappengerüsts in den Nitinol-Stent. Die zuvor präparierten Stege dienten als Verstärkung und wurden zunächst mit 6-0 Prolene in Einzelknopfnahntechnik an den Stent angenäht. Die Höhe im Stent sollte so gewählt werden, dass das distale Ende an der Spitze der distalen Raute fixiert werden konnte. Nun wurden die einzelnen Segel an den Segeltaschen, also auf der Ausflusseite, mit dem anliegenden Stent vernäht. Am besten eignete sich hierfür aufgrund des zarten Gewebes und der Tatsache, dass die ventrikuläre Seite nicht mit angenäht werden darf, 7-0 Prolene.

### **2.1.3 Dezellularisierung**

Die Prozesse der Dezellularisierung der Herzklappen, die Gewinnung der Zellen zur Besiedlung des Klappengerüsts sowie die Kultivierung im Bioreaktor wurden bereits veröffentlicht (Boldt et al. 2013, Bethge 2008, Tudorache et al. 2007). Zur Dezellularisierung der Herzklappen wurden die Klappenstents nach dem Einnähen der Klappen zur Dekontamination für 30 min bei Raumtemperatur in Povidon-Iod Lösung und sterilem PBS gewaschen. Nachfolgend wurde der Klappenstent für eine Nacht bei 4 °C in einer antibiotischen Lösung gelagert. Die Klappenstents wurden nun für 12 Stunden in einem 3-dimensionalen Mischapparat in einem Gemisch aus 0,02 % EDTA und 0,05 % Trypsin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> dezellularisiert. Es folgte eine weitere Waschung für 24 Stunden in PBS.

### **2.1.4 Zellgewinnung der CD133 positiven Zellen/Besiedlung/Bioreaktor**

Die Zellgewinnung von CD133 positiven Zellen erfolgte aus dem Knochenmark der Versuchstiere. Hierzu wurden 5 ml entnommen, mit PBS verdünnt und anschließend langsam auf Ficoll schichtweise aufgetragen. Nach einer Gradientenzentrifugation entstand ein mittlerer Ring, welcher die CD133 positiven Zellen enthielt. Die isolierten Zellen wurden auf einer 96 Gut Platte mit dem Zellkulturmedium M199 unter Zugabe von 1 % Penicillin-Streptomycin, 10 % fetalem Kalbserum und rekombiniertem humanem Fibroblastenwachstumsfaktor kultiviert.

Die Besiedlung des Klappengerüsts mit den zuvor kultivierten CD133 positiven Zellen war der nächste Schritt. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert und nach Einbringen in ein Kultiviermedium auf die dezellularisierten Klappen aufgetragen. Der Besiedlungsprozess wurde kontinuierlich für drei Tage in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

Der Klappenstent wurde nach der Besiedlung in einen pulsatilen Fluss-Bioreaktor gegeben und für 16 Tage bei definierten Frequenzen, Drücken und Flüssen (1 Hz, 60/40 mmHg, 3 l/min) belassen. Es folgte eine erneute Besiedlung mit CD133 positiven Zellen im Inkubator für 3 Tage. Alle 4 Tage wurden 5 ml PS-Supplement hinzugegeben und die Vitalität der Zellen wurden regelmäßig geprüft.

### **2.1.5 Zellgewinnung A. carotis/Besiedlung/Bioreaktor**

Zunächst wurde jeweils ein Stück A. carotis operativ entfernt. Das umgebende Bindegewebe wurde entfernt. Für die Gewinnung der SMC wurde der Gefäßabschnitt mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) gespült, der Gefäßabschnitt aufgeschnitten und das Endothel stumpf entfernt. Es folgte die Zerkleinerung des Gewebes in DMEM Lösung und Lagerung in einer Petrischale zur Trocknung. Im Anschluss wurde erneut DMEM hinzugegeben und das Gewebe für 7 Tage im Brutkasten bei 37 °C inkubiert. Hiernach hatte sich ein Film aus SMC auf der Petrischale gebildet und konnte weiter verwendet werden.

Für die Gewinnung der Endothelzellen wurde der Gefäßabschnitt zunächst mit DMEM gespült und anschließend mit einer steril angefertigten 0,2 % Collagenase-A in PBS Lösung befüllt und mit Klemmen verschlossen. Nach Inkubation für 20 min im Brutschrank wurde mit DMEM gespült, die Spüllösung aufgefangen und 4 min bei 37 °C zentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen stellten die Endothelzellen dar und wurden mit DMEM versetzt und auf 24-Lochplatten aufgetragen, die ebenfalls mit der o.g. Collagenase A Lösung beschichtet waren. Diese wurden erneut im Brutkasten bei 37 °C inkubiert.

Alle 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Nach Bildung eines Monolayers wurden die Zellen trypsiniert und nach Vitalitätsprüfung wurde die Besiedlung der dezellularisierten Klappen begonnen. Zunächst wurden die SMC aufgetragen und im Bioreaktor angezüchtet. Nachfolgend wurden die Endothelzellen aufgetragen und der Klappenstent erneut im Bioreaktor gelagert. Nach insgesamt 25 Tagen war das Tissue Engineering mit SMC und Endothelzellen beendet.

## 2.2 Implantation

### 2.2.1 Vorbereitung und Anästhesie



*Abb. 4 Lagerung und Vorbereitung eines narkotisierten Versuchstiers*

Die Tiere wurden vom Tierstall an der Christian-Albrechts-Universität unter Sedierung in einer Transportbox zum Herzkatheterlabor gefahren. Im Herzkatheterlabor wurden die Schafe nach Legen eines peripheren Zugangs im Ohr auf dem Patiententisch zunächst in Bauchlage gelagert und von mindestens zwei Assistenten gehalten. Es erfolgte nun die Einleitung der Narkose mit Ketanest und Xylazin gewichtsadaptiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mittels Propofolperfusor und Boli an Ketanest und Fentanyl. Es wurde ein Single-shot-Antibiotikum mit Cefuroxim i.v. gegeben. Nun wurde das Schaf intubiert und an die Beatmung angeschlossen. Nach Sicherung der gelegten Zugänge wurde das Tier in Rückenlage gedreht. Die Extremitäten wurden mit Klettverschlüssen an Seilen fixiert, sodass das Schaf auf dem Patiententisch gesichert war. Das Schaf wurde nun im Brustbereich und in den Leisten geschoren und mit einem Einwegrasierer vorbereitet. Zum weiteren Monitoring wurden EKG-Elektroden befestigt.

### 2.2.2 Punktion und Kontrastmitteldarstellung

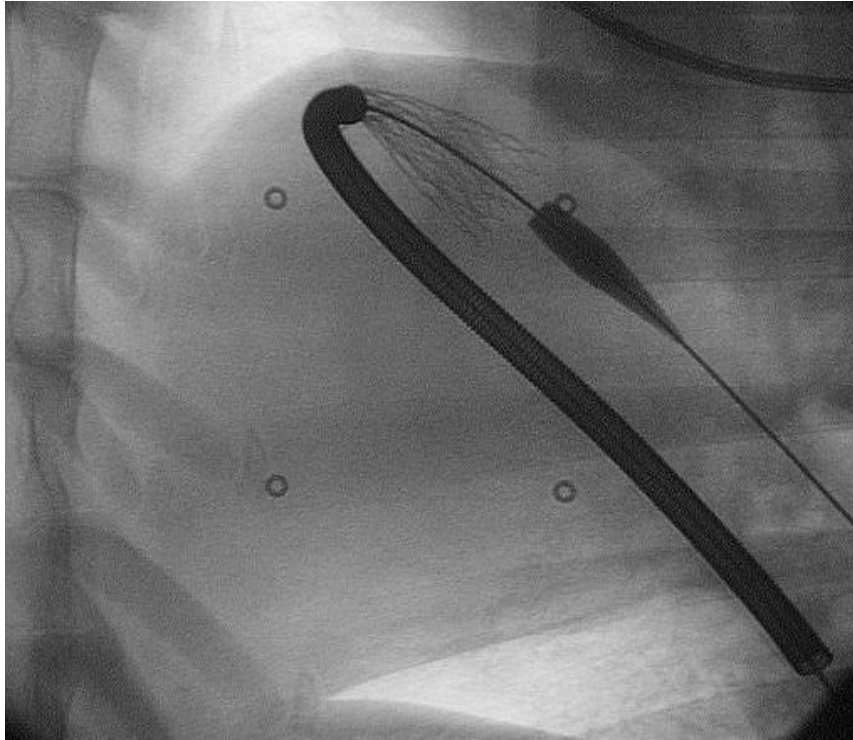
Das Schaf wurde steril abgewaschen und abgedeckt. Es erfolgte die Palpation und/oder Ultraschall der Femoralarterie, medial hiervon wurde die V. femoralis mit einer Kanüle punktiert. Nach erfolgreicher Punktion wurde ein Draht über die Nadel in das Gefäß eingebracht. Nach Entfernung der Nadel wurde über den Draht eine Stichinzision der Haut durchgeführt und über den Draht ein Dilatator vorgeschoben. Dieser wurde wieder entfernt und eine 24 French Schleuse über den Draht eingebracht. Nun wurde der Draht entfernt. Nach Einbringen eines Katheters in die Schleuse wurde dieser bis in den rechten Vorhof vorgeschoben und eine Kontrastmitteldarstellung des rechten Ausflusstraktes durchgeführt. Anschließend wurden die Drücke im rechten Vorhof, im rechten Ventrikel sowie in dem A. pulmonalis Hauptstamm gemessen.

### 2.2.3 Klappenstentplatzierung und Expansion

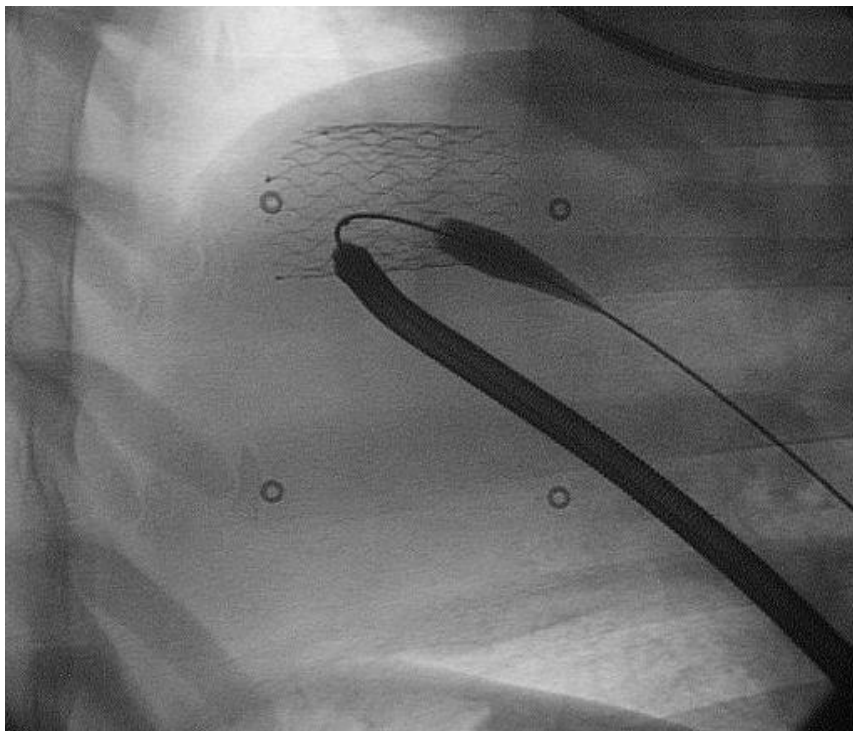


*Abb. 5 Der gefaltete Klappenstent im Applikator    Abb. 6 Expansion des Klappenstents*

Daraufhin wurde der Katheter wieder entfernt. Für die Implantation wurde Heparin i.v. gegeben. Nun wurde der 22 French Applikator mit dem Klappenstent bestückt und über die Schleuse zum Herz vorgeschoben. Der Applikator wurde auf Höhe der nativen Klappe platziert, die Lagekontrolle erfolgte mittels Röntgenkontrastdarstellung. Nun wurde der Klappenstent platziert und die Lage kontrolliert. Der Applikator wurde wieder entfernt, wobei darauf zu achten war, bei dem Herausziehen des Applikators den gerade platzierten Klappenstent in seiner Lage nicht zu verschieben. Es folgte die Antagonisierung mit Protamin.



*Abb. 7 TE 35 Fluoroskopie mit Expansion des Klappenstents*



*Abb. 8 TE 35 Fluoroskopie, expandierter Klappenstent in orthotoper Lage*

## 2.2.4 Lagekontrolle und Beendigung des Eingriffs

Zur abschließenden Lagekontrolle wurde erneut ein Katheter über die Schleuse eingebracht und eine Kontrastmitteldarstellung durchgeführt. Zudem wurden erneut die Drücke im Vorhof, dem Ventrikel und im Ausflusstrakt gemessen. Anschließend wurde der Katheter entfernt und die Schleuse ebenfalls herausgezogen. Auch die Drucksonde in der linken Femoralarterie wurde entfernt. Die Punktionsstellen wurden mit einem Druckverband versorgt und mindestens 15 min durch permanenten manuellen Druck mit der Faust komprimiert. Die Narkose wurde beendet und nach Einsetzen der eigenen Atmung wurde das Schaf extubiert. Der venöse Zugang wurde ebenfalls entfernt. Das Schaf wurde in die Transportbox gelegt und wieder in den Tierstall an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zurück transportiert.

Tab. 1 Implantationsdaten

Schaf	Annahme Position in Durchleuchtung	Zellherkunft für Tissue Engineering	Gewicht in kg
TE 33	nicht orthotop, Klappenstent distal vom Anulus	A. carotis	40,2
TE 34	orthotop	A. carotis	43,2
TE 35	orthotop	A. carotis	37,3
TE 36	nicht orthotop, Klappenstent zu weit im Pulmonalbulbus	A. carotis	46,3
TE 41	orthotop	A. carotis	50
TE 42	nicht orthotop, Klappenstent proximal zum Anulus	A. carotis	33
TE 44	nicht orthotop, Klappenstent proximal zum Anulus	A. carotis	30
TE 45	nicht orthotop, Klappenstent distal im Anulus	Knochenmark	33
TE 46	orthotop	Knochenmark	30
TE 52	orthotop	Knochenmark	39

### **2.2.5 Nachsorge**

Die Tiere wurden an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in dafür vorgesehenen Tierställen durch examiniertes Tierpflegepersonal gehalten. Tierärztin Frau Dr. med. vet. Telse Bähr beurteilte in regelmäßigen Abständen den klinischen Zustand der Tiere.

## **2.3 Explantation**

### **2.3.1 Vorbereitung und Anästhesie**

Die Vorbereitung und Anästhesie zur Explantation erfolgte auf eine sehr ähnliche Art wie zur Implantation wie unter 2.2.1 zuvor beschrieben.

### **2.3.2 Punktion und Kontrastmitteldarstellung**

Das Schaf wurde steril abgewaschen und abgedeckt. Nach Punktion der V. femoralis rechts wurde eine Schleuse wie in unter 2.2.2 beschrieben eingebracht. Nun wurde ein Katheter über die femorale Schleuse bis zum rechten Herzen vorgeschoben und eine Kontrastmitteldarstellung des rechten Ventrikels und des rechten Ausflusstraktes erfolgte. Dann wurden die Drücke des rechten Vorhofs, des rechten Ventrikels und des Pulmonalarterienhauptstammes gemessen und der Katheter anschließend wieder entfernt.

### **2.3.3 Euthanasie**

Die Euthanasie wurde durch hohe Gaben von Kaliumchlorid mit nachfolgender Asystolie ausgelöst. Dabei wurden hohe Dosen an Fentanyl und Ketanest verabreicht, um dem Versuchstier unnötiges Leid zu ersparen. Nach Feststellung des Todes durch die Tierärztin Frau Dr. med. vet. Telse Bähr wurde langsam mit der Explantation des Herzens begonnen.

### **2.3.4 Explantation und Beendigung des Eingriffs**

Hierzu wurde ein möglichst kleiner halbkreisförmiger Hautschnitt mit dem Skalpell am lateralen Thorax von kranial und laterodorsal bis hin zum Sternum, entlang des Sternums nach kaudal und von hier aus wieder nach laterodorsal kaudal gesetzt. Die Haut wurde vorsichtig nach dorsal präpariert und die Rippen dargestellt. Die Durchtrennung der Rippen nahe dem Sternum erfolgte mit einer chirurgischen Rippenschere. Die Rippen wurden nach Präparation der Interkostalmuskulatur kranial und kaudal nun manuell nach dorsal gezogen

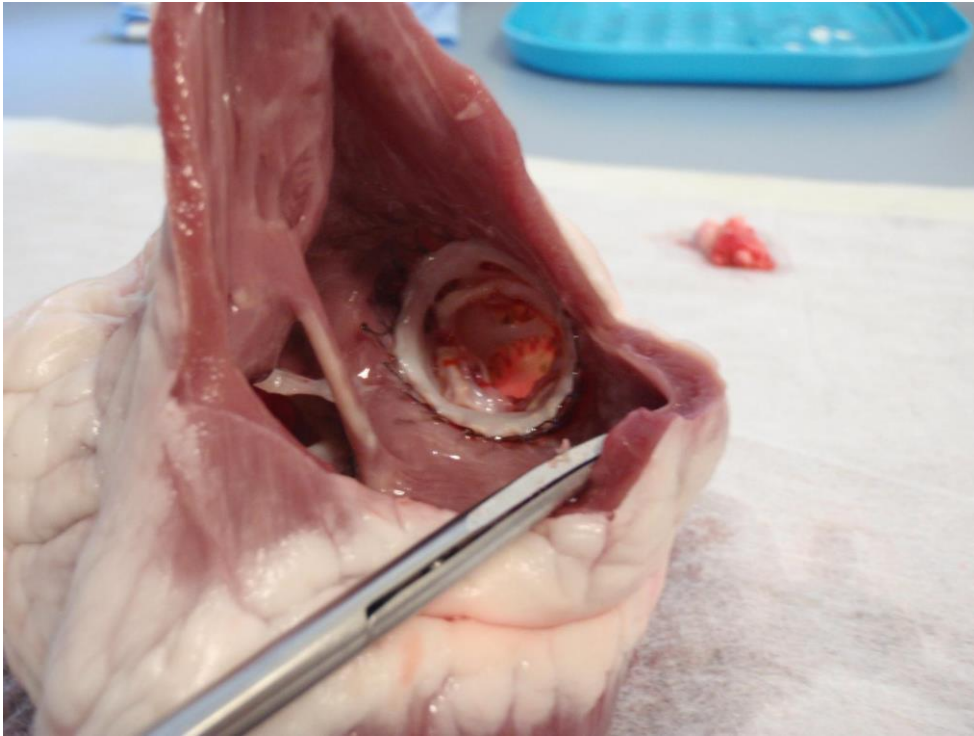
und am dorsalen Rand ebenfalls mit der chirurgischen Rippenschere durchtrennt, sodass die Thoraxwand eröffnet war. Die Lunge wurde vorsichtig zur Seite mobilisiert und das Perikard eröffnet. Das Herz wurde nun mit der Hand gefasst und die Gefäße mit der chirurgischen Schere durchtrennt.

Nach Explantation des Herzens wurde das Herz vorsichtig in einem Behälter mit isotoner NaCl-Lösung verstaut und zur weiteren Aufbereitung in das histologische Labor gebracht.



## 2.4 Resektion der Herzklappen und Einbettung

### 2.4.1 Präparation der Herzkammer und Resektion der Herzklappe



*Abb. 9 TE 35 Explantation des Klappenstents*

Der rechte Ventrikel wurde vorsichtig mit einer Metzenbaum Präparierschere eröffnet und der Klappenstent sowohl von ventrikelseitig als auch von der Pulmonalarterie aus mit der Metzenbaum Präparierschere und anatomischen Pinzette aus dem Stentbett herauspräpariert.



*Abb. 10 TE 35 Der explantierte Tissue engierte Klappenstent nach 3 Monaten Beobachtungszeit*

Anschließend wurde die Klappe unter Schonung der Tissue engierten Segel mit der Schere und Pinzette aus dem Klappenstent herauspräpariert. Die Segel wurden in 4 % Formalin Lösung bis zur Einbettung in Paraffin gelagert. Dann erfolgte die Einbettung in Paraffin, um Schnitte für die histologischen Untersuchung anfertigen zu können.

#### **2.4.2 Definition der orthotopen Platzierung**

Für die definitive Einteilung, ob ein Klappenstent orthotop oder nicht-orthotop platziert wurde, wurden Parameter festgelegt. Die Kriterien für eine orthotope Platzierung war die Abdeckung der nativen Herzklappen sowie ein nicht zu weites Hineinragen des Klappenstents in den rechten Ventrikel, sodass das Myokard beschädigt werden könnte. Toleriert wurde hier ein Hineinragen des Klappenstents um eine Rautenlänge bzw. maximal 15 mm ab Klappenniveau. Damit die nativen Klappen vollständig von dem Klappenstent abgedeckt wurden, durfte der Klappenstent maximal eine halbe Rautenlänge, ca. 8 mm ab Klappenniveau zu weit distal platziert sein.

### 2.4.3 Klassifikation der nicht-orthotopen Platzierung

Somit wurden die Klappenstents als nicht-orthotop bezeichnet, welche die native Pulmonalklappe nicht abgedeckt haben, z.B. weil der Klappenstent über 8 mm zu weit distal platziert wurde, oder über 15 mm nach proximal in den rechten Ventrikel platziert wurde, sodass ein Kontakt zum Myokard der rechten Ventrikelwand bestand. Die Fehllage wurde in zwei Gruppen klassifiziert: Die non-orthotopic stent position (NOSP) 1 bezeichnet die Klappenstents, die außerhalb der orthotopen Lage platziert wurden, jedoch nicht in den Ventrikel oder bis an die Bifurkation disloziert waren. Die zu weit proximal platzierten Klappenstents wurden mit Typ A bezeichnet, die zu weit distal platzierten Klappenstents mit Typ B. Die NOSP 2 klassifizierten Klappenstents waren entweder in den Ventrikel (Typ A) oder bis an die Bifurkation (Typ B) disloziert.

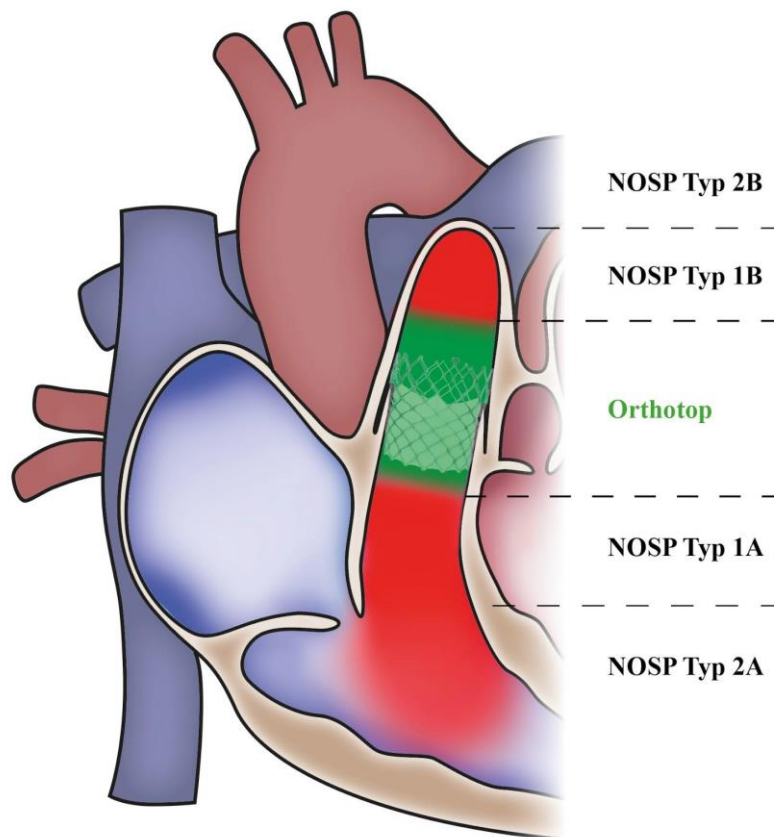
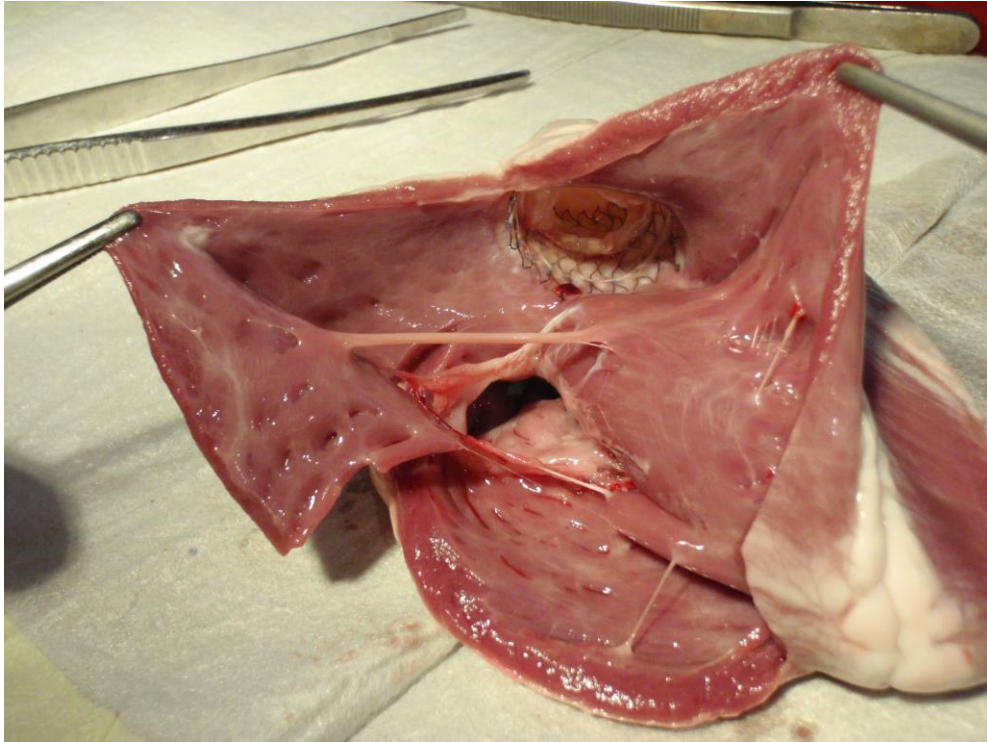
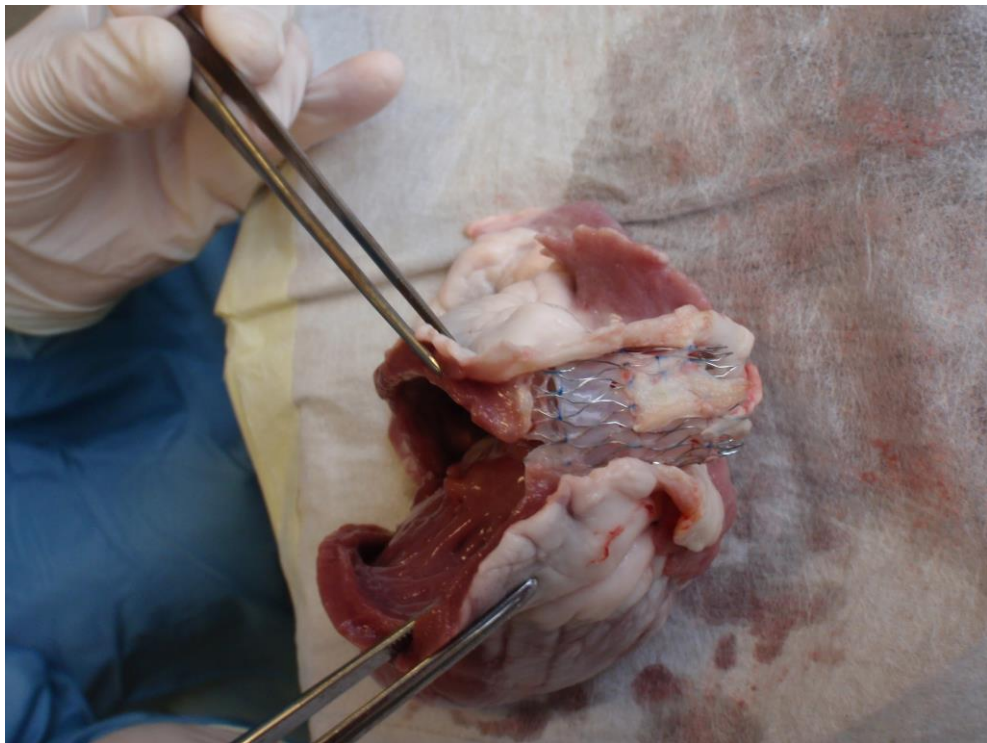


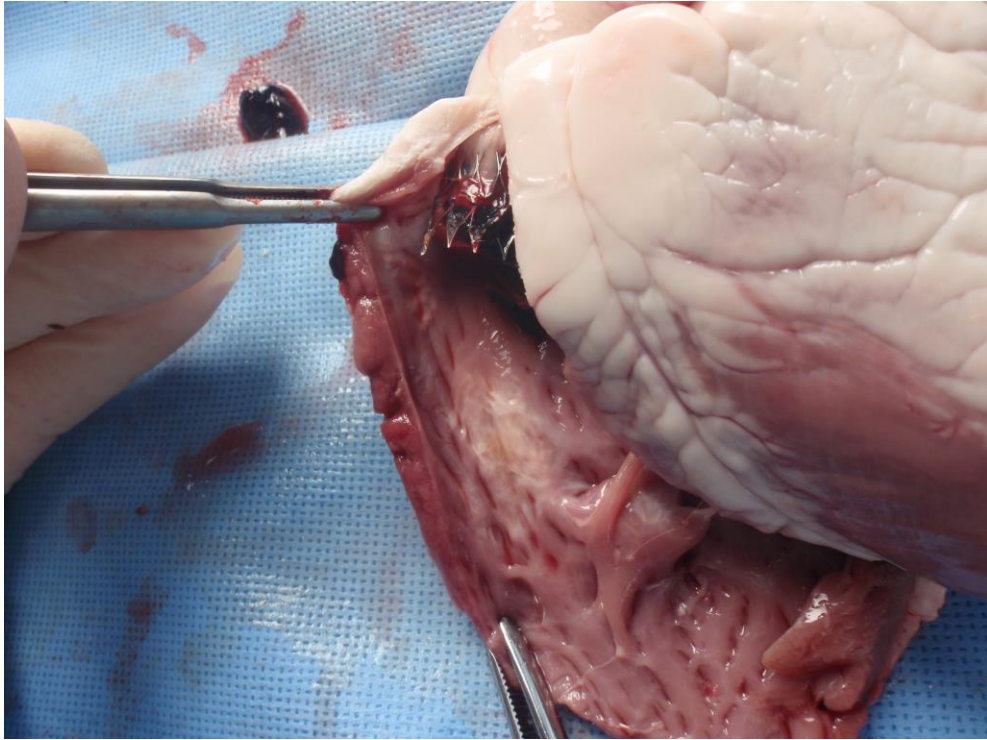
Abb. 11 Klassifikation der non-orthotopic stent position



*Abb. 12 TE 34 Ideal platzierter Klappenstent*



*Abb. 13 TE 45 Klappenstent ein wenig zu weit distal,  
die native Klappe wird so nicht vollständig abgedeckt*



*Abb. 14 TE 42 1. Klappenstent zu weit proximal im Ventrikel mit geringem Kontakt zum Myokard*

Tab. 2 Explantationsdaten

Versuchstier- Bezeichnung	Tage nach Implantation	Anzahl Rauten	mm	Position	Nativklappe abgedeckt
TE 33	104	2,5 zu distal	37	an Bifurkation	nein
TE 34	98	1/4 im Ventrikel	4	ideal	ja
TE 35	105	1/2 im Ventrikel	7	gut, gering Richtung Ventrikel	ja
TE 36	111	1,5 im Ventrikel	23	gut, aber im Pulmonalbulbus mit Kontakt zur Ventrikelwand	ja
TE 41	95	1 im Ventrikel	13	gut, mehr Richtung Ventrikel, noch kein Kontakt	ja
TE 42	91	2 im Ventrikel (1. Klappenstent)	31	befriedigend, aber im Ventrikel mit Kontakt, 2. Klappentent etwas zu distal (Stent-in-Stent)	ja
TE 44	123	3 im Ventrikel (1. Klappenstent)	44	unbefriedigend, disloziert in Ventrikel, 2. Klappenstent orthotop	Nein
TE 45	125	1 zu distal	13	unbefriedigend, zu distal	teilweise
TE 46	133	1/2 im Ventrikel	8	gut, mehr Richtung Ventrikel, noch kein Kontakt	ja
TE 52	98	1/2-1 im Ventrikel	8-14	gut, jedoch schräg	ja

## 2.5 Histologische Untersuchungen

Die histologischen Färbungen sowie deren Untersuchungen wurden alle in den Forschungslaboren der Experimentellen Herzchirurgie Prof. Dr. med. Georg Lutter von mir unter Anleitung von Frau Dr. rer. nat. Anja Metzner, Frau Dr. rer. nat. Jessica Boldt und Frau Birgit Pieper durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Anja Metzner wurden die Färbemethoden für die histologischen Strukturen, die für diese Arbeit und deren Fragestellung interessant waren, ausgewählt. Anschließend wurde mit Frau Dr. rer. nat. Jessica Boldt die Tiere aus einem Katalog der Versuchsreihen entnommen, welche die Kriterien der Arbeit erfüllten. Diese waren sowohl die Tiere, bei denen der Klappenstent korrekt platziert wurde, als auch diejenigen, bei denen es zu einer Fehlplatzierung

gekommen war. Alle Versuchstiere sollten einen ähnlich langen Zeitraum postoperativ überlebt haben, ca. 1-6 Monate, und nicht an einer Komplikation verstorben sein. Nach Auswahl der Versuchstiere und der Färbemethoden wurde ich durch Frau Dr. rer. nat. Anja Metzner, Frau Dr. rer. nat. Jessica Boldt und Frau Birgit Pieper in die Abläufe und das eigenständige Arbeiten im Labor eingewiesen. Die histologischen Untersuchungen wurden von 2012 bis 2014 durchgeführt.

Vor meinem Beginn der histologischen Arbeit war ich vor allem bei den Tier-OPs sowie beim Transport der Tiere mit zuständig. Zusammen mit Frau Dr. rer. nat. Anja Metzner wurden die histologischen Schnitte mit einer normalen Herzklappe verglichen und anhand ihrer Unterschiede in ein System eingestuft, welches die folgenden Tabellen (s.u.) darlegen.

## **2.5.1 Durchführung der Färbungen**

### **2.5.1.1 Anfertigung der Schnitte**

Für die histologischen Untersuchungen wurden Schnitte von 3 µm Dicke angefertigt. Hierfür wurden die in Paraffin eingebetteten Präparate auf einer Kühlplattform zunächst abgekühlt, um ein optimales Schnittergebnis zu erreichen. Die Paraffinblöcke wurden dann in das Mikrotom eingespannt und unter automatischem Messervorschub die Schnitte angefertigt. Vor allem bei sehr verkalkten Präparaten zeigte sich die manuelle Schnittführung mit der Handkurbel jedoch als effizienter. Die so gewonnenen Schnitte wurden mit Hilfe eines warmen Wasserbads auf Adhäsionsobjektträgern aufgebracht und über Nacht bei 35 °C getrocknet.

Für die Übersicht diente die Pentachrom-Färbung nach Movat, welche die Muskulatur rot, Kerne sowie elastische Fasern schwarz, Kollagen violett, Fibrin intensiv rot und die Grundsubstanz blau färbt. Dadurch ließen sich die Schichtung der Klappen besonders gut darstellen und wurden bereits in anderen Studien zur Beurteilung der grundlegenden Architektur der Klappen verwendet (Stephens und Grande-Allen 2007). Zur allgemeinen Differenzierung zwischen kollagenem Bindegewebe und Muskulatur und elastischen Fasern wurden die Schnitte nach van Giesson gefärbt. Diese Färbung diente aufgrund ihrer deutlichen Gegenfärbung der Kerne für die Auszählung der Zellen pro Schnitt. Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbungen von Kollagen I und Kollagen III sollte deren Verteilung vor allem in der Herzklappe dargestellt werden.

### **2.5.1.2 Pentachrom Färbung nach Movat**

Nach Entparaffinierung in Xylol (3x5 min) erfolgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (Ethanol 100 %, Ethanol 96 %, Ethanol 80 %, Ethanol 70 %, Aqua Dest, jeweils 5 min). Die erste Färbung erfolgte mit filtriertem Alcianblue 1 % für 20 min. Nach gründlichem Spülen unter Leitungswasser, 60 min Einwirken in alkalischen Alkohol (20 ml Ammoniak, 180 ml Ethanol 96 %) und erneuter Spülung erfolgte die Färbung mit Resorcinfuchsin. Nach erneuter Spülung wurde für 2 min mit Eisenchlorid 2 % differenziert und mit Natriumthiosulfat für 1 min gefärbt. Nach Spülung wurde mit Crocein-Scarlet-Säurefuchsin für 5 min gefärbt. Wieder wurde gespült und kurz in Essigsäure 0,5 % geschwenkt, sodass eine erneute Differenzierung mit Phosphorwolframsäure 5 % möglich war. Das Schwenken in Essigsäure 0,5 % wurde wiederholt und dann in Ethanol 100 % eingewirkt, sodass die letzte Färbung mit der Saffron-Lösung unter erhöhten Sicherheitsmaßnahmen (Abzug, Mundschutz, Handschuhe) erfolgen konnte. Nach erneutem Einwirken in Ethanol 100 % wurde nochmal in Xylol (3x5 min) eingelegt und danach mit einem Eindeckmedium eingedeckelt.

### **2.5.1.3 Van Gieson Färbung**

Zunächst war auch hier das Entparaffinieren mit Xylol sowie die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe wie oben bereits erwähnt notwendig. Nun folgte die erste Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert. Nach 5-10 min Einwirkzeit wurden die Schnitte in Aqua Dest gespült und anschließend in Leitungswasser für 10 min gebläut. Nun erfolgte die zweite Färbung mit Pirkinsäure-Thiazinrot für 3-5 min. Nach erneuter Spülung mit Aqua Dest wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol wieder dehydriert und mit einem Eindeckmedium eingedeckelt.

### **2.5.1.4 Immunhistochemie**

Die immunhistochemischen Färbungen begannen ebenfalls mit der Entparaffinierung mit Xylol und der absteigenden Alkoholreihe. Hiernach wurden die Schnitte mit Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle auf Stufe 2 für 15 min erhitzt. Hierbei musste unbedingt darauf geachtet werden, dass zu allen Zeiten ausreichend Citratpuffer vorhanden war und ein Überkochen vermieden wurde. Das zu verwendende Glas musste zudem mikrowellenbeständig sein. Anschließend ließ man den Citratpuffer samt der Schnitte auf Raumtemperatur abkühlen. Nach Spülung mit Aqua Dest erfolgte die Hemmung mit



Peroxidase für 10 min bei Raumtemperatur. Nach erneuter Spülung in Aqua Dest wurden die Schnitte mit dem Fettstift doppelt umrandet und überschüssige Flüssigkeit vorsichtig mit Zellstoff abgetupft, ohne das Präparat zu berühren. Nun wurde zur Blockierung ein bis zwei Tropfen Ziegen Serum aufgetragen. Die Schnitte wurden daraufhin in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für eine Stunde gelagert. Das Serum wurde dann abgeklopft und der erste Antikörper (Anti-Kollagen I bzw. Anti-Kollagen III) mit der Pipette aufgetragen. Die Schnitte wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Am Folgetag wurden die Schnitte in drei Gläsern mit PBS jeweils 5 min gewaschen. Nach Abklopfen überschüssiger Flüssigkeit wurden ein bis zwei Tropfen des zweiten Antikörpers (Histofine) mit der Pipette aufgetragen und für 45 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut in PBS wie oben beschrieben gewaschen. Nun wurden ein bis zwei Tropfen des Chromogensubstrats (DAB+) auf die Schnitte gegeben und erneut in der feuchten Kammer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Gegenfärbung mit Meyers Hämalaun für 1 min und die Bläuung unter fließendem Leitungswasser für 5 min. Abschließend wurde die aufsteigende Alkoholreihe und nach insgesamt 15 min Xylol-Bad die Deckelung mit einem Eindeckmedium durchgeführt.

## **2.5.2 Graduierung und Auswertung**

### **2.5.2.1 Schichtung**

Die Einteilung der Schichtung der Herzklappen erfolgte nach dem dreischichtigen Modell der Herzklappen (Combs und Yutzey 2009). Das zum Ventrikel hin gelegene Kompartiment wurde als Lamina ventrikularis bezeichnet, die mittlere Schicht aus überwiegend kollagenem Bindegewebe als Lamina spongiosa und schließlich die zum Gefäß hin gelegene Lamina fibrosa. Die Graduierung der Präparate erfolgte an den mittels Movat pentachrom gefärbten Schnitten, da hier eine Schichtdifferenzierung aufgrund der vielseitig angefärbten Strukturen möglich war.

In Tabelle 5 (Seite 46) wurden die Schnitte nach einer möglichen Schichtdifferenzierung graduiert, unterschieden wurde zwischen orthotop platzierten und nicht-orthotop platzierten Klappen. Mit dem Wert 0 wurden die Präparate bezeichnet, bei denen eine Schichtung nicht mehr erkennbar war. Wert 1 bedeutete, dass zumindest eine der o.g. Schichten abgrenzbar war und Wert 2 stand für eine normale dreischichtige Klappenarchitektur.

### **2.5.2.2 Hyperthrophie**

In dieser Untersuchung wurde die Architektur der Pulmonalarterie im Bereich des Stentbetts untersucht. Gefäße reagieren auf unterschiedliche Druckbelastungen mit einer Hypertrophie der Tunica media (Heath 1973). Die Schnitte wurden anhand der Ausprägung der Hypertrophie der Tunica media Anhand einer Nativkontrolle in drei Grade eingeteilt. Wert 0 erhielten Schnitte mit einer normalen, nicht hypertrophierten Gefäßarchitektur, Wert 1 stand für eine leichte Hypertrophie und Wert 3 bedeutete eine ausgeprägten hyperthrophen Umbau. Für die Versuchsgruppe der orthotop platzierten Klappenstents TE 35 lagen keine Präparate der stenttragenden Pulmonalarterie vor und da die Tiere bereits entsorgt waren, konnten in diese nicht in die Studie einbezogen werden. Da das Hauptinteresse an den Klappen und deren histologische Veränderung lag, wurden die Segel von TE 35 in die Untersuchung einbezogen.

### **2.5.2.3 Kollagen I und III**

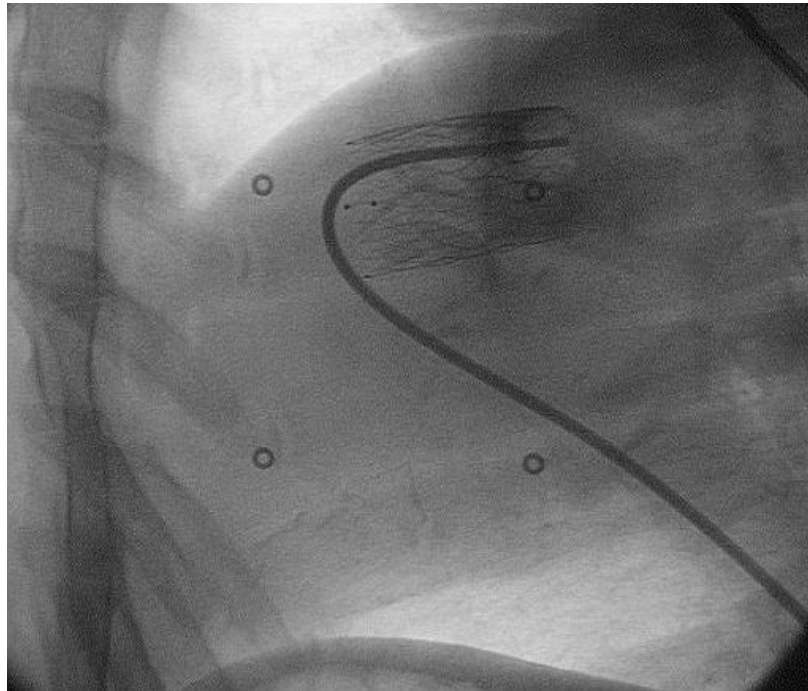
Im Rahmen des Tissue Engineering wurden Zellen auf das Klappengerüst aufgetragen, die zur Bildung einer normal Klappenarchitektur befähigt sind. Da Herzklappen zum größten Teil aus Kollagen bestehen und die Kollagene I und III maßgeblich für die Funktion und Langlebigkeit der Klappen sind (White et al. 2010), wurden die immunhistochemischen Färbungen der Schnitte zur Einschätzung der gewünschten Produktion von Kollagen angefertigt. Dabei wurde in 5 Grade unterteilt, wobei die Grade 0 bis 1 für eine Unterproduktion und im Umkehrschluss für ein nicht ausreichendes Zellwachstum standen. Die Grade 2 bis 3 standen für eine normale Produktion von Kollagen und Grad 4 für eine Überproduktion. Die Grade wurden anhand von Nativkontrollen in Vergleich gestellt. Kollagen III stellt den zweiten Hauptbestandteil der Herzklappe dar und wurde daher auf gleiche Weise untersucht wie zuvor bei Kollagen I.

### **2.5.2.4 Zellpopulation**

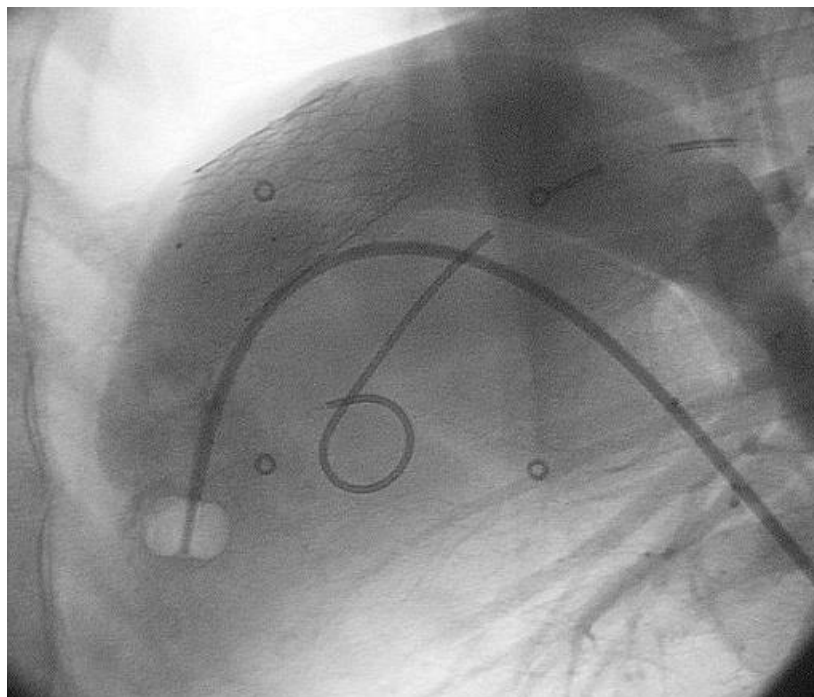
Die Anzahl der Zellkerne wurde anhand von van-Giesson Färbungen beurteilt und mittels Markierung in dem Softwareprogramm Paint<sup>®</sup> ausgezählt. Diese spiegelte den Bestand an Zellen insgesamt wider, jedoch war eine erhöhte Anzahl an Zellkernen mit einer Infiltration mit Entzündungszellen anzunehmen, insbesondere bei morphologisch Hinweis auf Lymphozyten.

# Ergebnisse

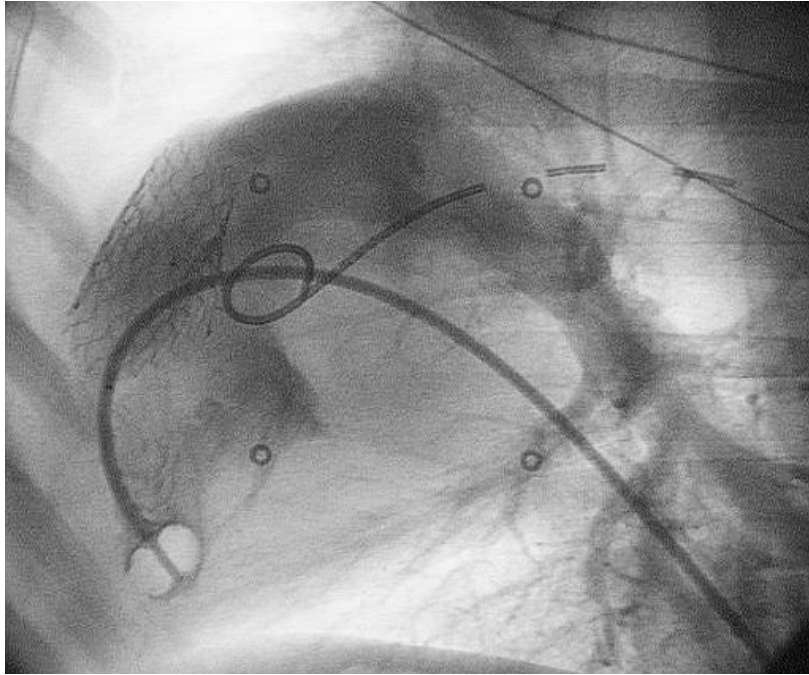
## 3.1 Fluoroskopie und Stentposition



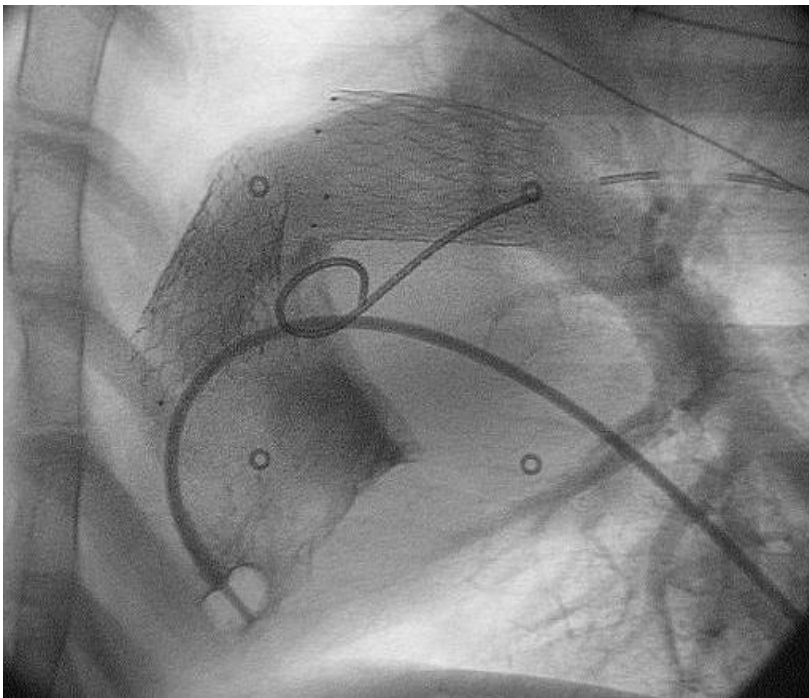
*Abb. 15 TE 34 Fluoroskopie, orthotope Lage des Klappenstents*



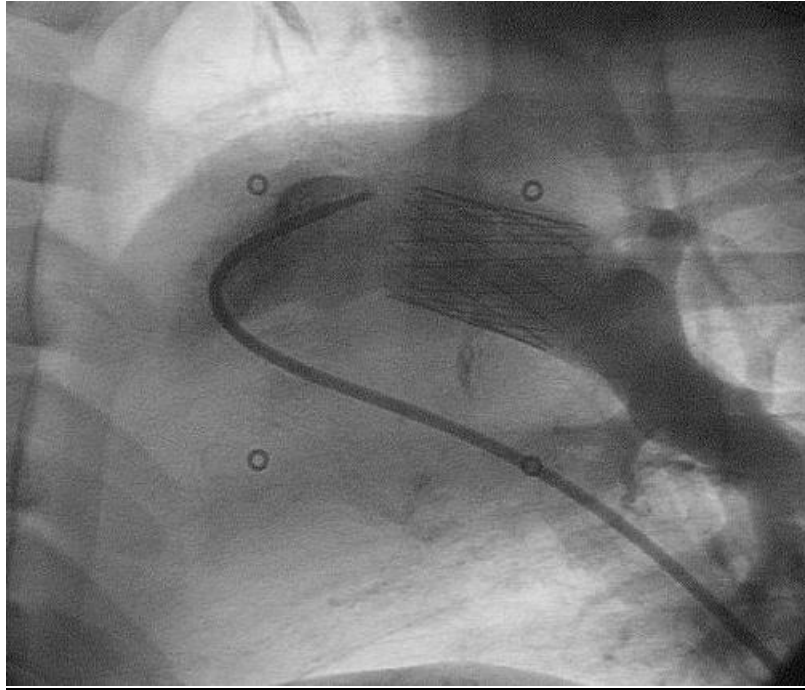
*Abb. 16 TE 41 Fluoroskopie, orthotope Lage des Klappenstents*



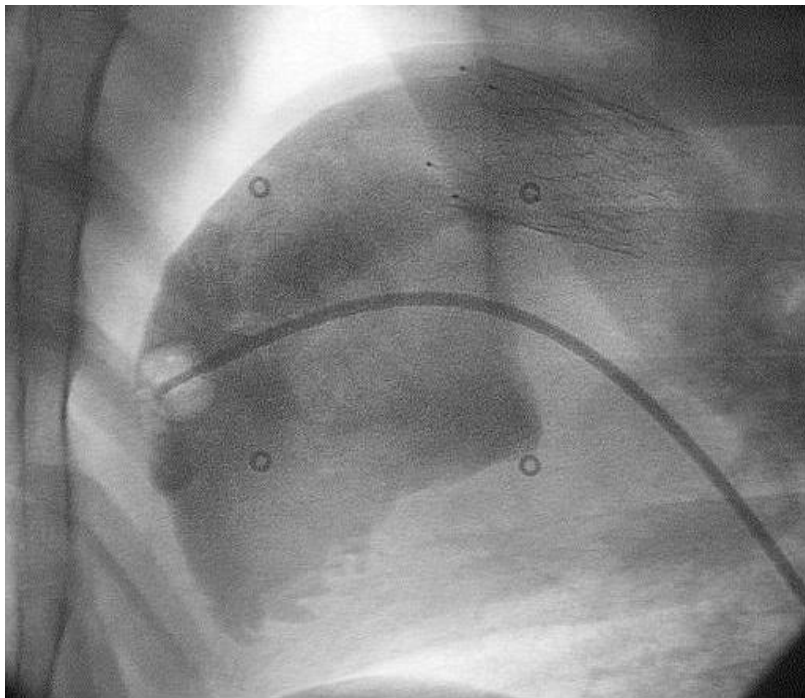
*Abb. 17 TE 44 Fluoroskopie, NOSP 2A, Klappenstent in den Ventrikel disloziert*



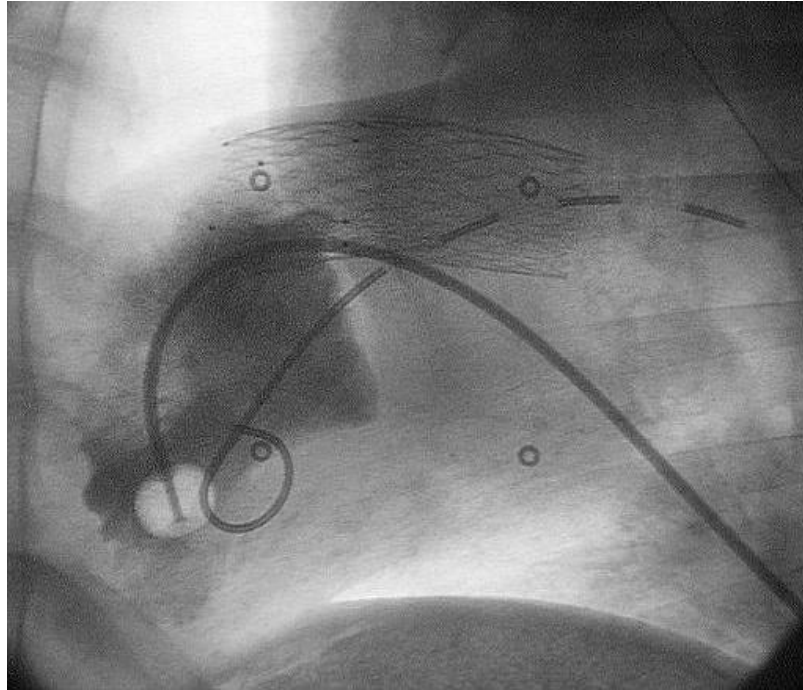
*Abb. 18 TE 44 Fluoroskopie, nach Implantation des 2. Klappenstents in orthotoper Position*



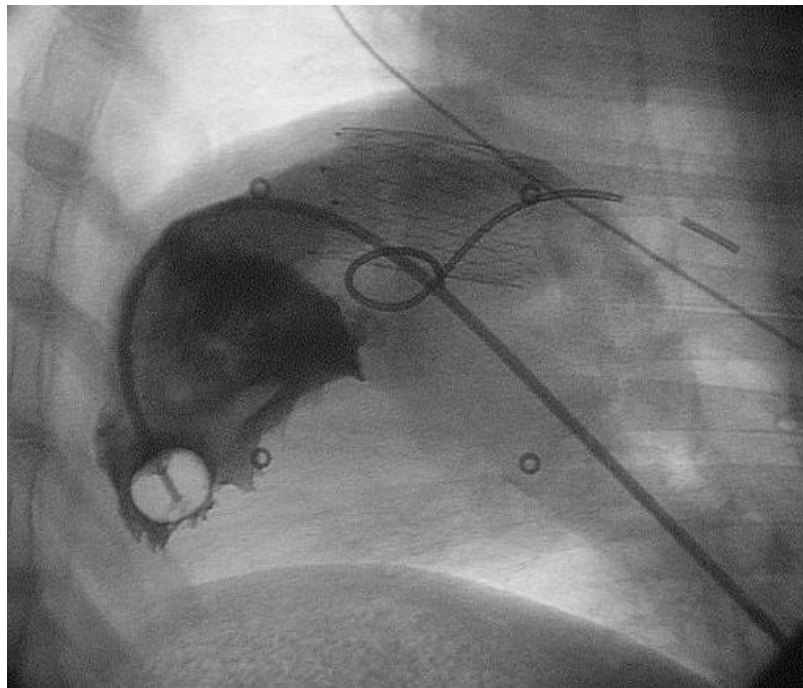
*Abb. 19 TE 33 Fluoroskopie, NOSP 2B, Klappenstent an Bifurkation*



*Abb. 20 TE 36 Fluoroskopie, NOSP 1A, Klappenstent zu proximal mit Kontakt zum Ventrikel*



*Abb. 21 TE 42 Fluoroskopie, NOSP 1A, 1. Klappenstent zu weit proximal mit Kontakt zum Ventrikel, 2. Klappenstent etwas zu distal*



*Abb. 22 TE 45 Fluoroskopie, NOSP 1B, Klappenstent in zu distal, die Nativklappe wird nur partiell abgedeckt*

Tab. 3 Klassifikation der Stentlage

Versuchstier- Bezeichnung	Position	Nativklappe abgedeckt	Beurteilung der Position	NOSP Klassifikation
TE 33	an Bifurkation	nein	nicht-orthotop	Typ 2B
TE 34	ideal	ja	orthotop	--
TE 35	gering Richtung Ventrikel	ja	orthotop	--
TE 36	im Pulmonalbulbus mit Kontakt zur Ventrikelwand	ja	nicht-orthotop	Typ 1A
TE 41	mehr Richtung Ventrikel, noch kein Kontakt	ja	orthotop	--
TE 42	im Ventrikel mit Kontakt Implantation eines zweiten Klappenstents (Stent-in-Stent)	ja	nicht-orthotop	Typ 1A
TE 44	disloziert in Ventrikel, Implantation eines zweiten Klappenstents	ja (durch 2. Klappenstent)	nicht-orthotop	Typ 2A
TE 45	zu distal	teilweise	nicht-orthotop	Typ 1B
TE 46	mehr Richtung Ventrikel, noch kein Kontakt	ja	orthotop	--
TE 52	gering schräg	ja	orthotop	--

Aus der oben gezeigten Tabelle 3 wird ersichtlich, dass bei den Versuchstieren TE 34, 35, 41, 46 und 52 die Klappenstents orthotop platziert wurden. Bei den Versuchstieren TE 33, 36, 42, 44 und 45 hingegen wurde eine orthotope Platzierung nicht oder nicht vollständig erreicht. Darunter kam es bei TE 33 und TE 44 zu dem mit Typ 2 klassifizierten Fehllagen des Klappenstents: TE 33 zeigte eine Dislokation bis an die Bifurkation (NOSP Typ 2B), während bei TE 44 der Klappenstent in den Ventrikel disloziert war (NOSP Typ 2A). Die übrigen als nicht-orthotop klassifizierten Klappenstents zeigten keine grobe Dislokation auf und wurden somit mit NOSP Typ 1 klassifiziert. Bei den Versuchstieren TE 42 und TE 44 wurden zwei Klappenstents implantiert. Bei TE 44 wurde bei schon sichtbarer Dislokation des ersten Klappenstents in den Ventrikel ein zweiter Klappenstent in orthotoper Lage

platziert. Bei TE 42 erfolgte eine Stent-in-Stent Implantation, da bereits in der Fluoroskopie eine nicht-orthotope Lage zu erkennen war. Der 2. Klappenstent recht jedoch etwas zu weit nach distal ohne Kontakt zur Bifurkation. Sowohl TE 42 als auch TE 44 wurde als nicht-orthotop klassifiziert, die nachfolgenden histologischen Färbungen wurden an den ersten Klappenstents durchgeführt.

### 3.2 Drücke im rechten Vorhof und Ventrikel

Tab. 4 rechtsatrialer (RAP) und rechtsventrikulärer Druck (RVP) vor und nach Implantation

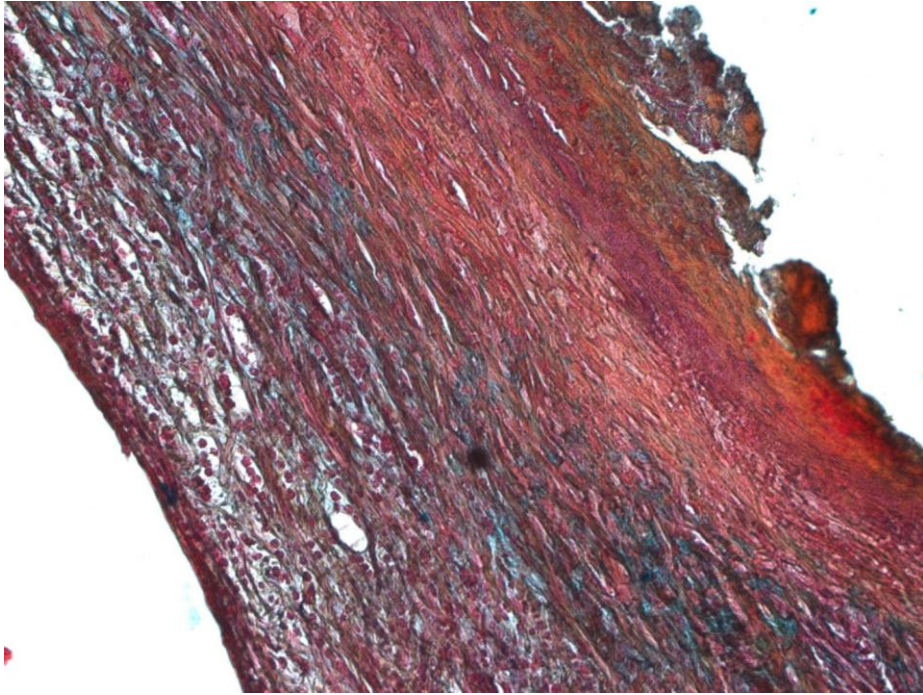
Versuchstier	Beurteilung Position	RAP vor Implantation	RAP nach Implantation	delta RAP	RVP vor Implantation	RVP nach Implantation	delta RVP
TE 33	nicht-orthotop	14/5	14/7	0/2	17/2	21/0	4/-2
TE 34	orthotop	18/8	21/8	3/0	16/5	30/4	14/1
TE 35	orthotop	22/5	18/9	-4/4	17/2	28/1	11/-1
TE 36	nicht-orthotop	25/19	19/7	-4/-12	17/2	23/2	6/2
TE 41	orthotop	18/7	17/7	-1/0	20/8	29/4	9/-4
TE 42	nicht-orthotop	17/9	18/8	1/-1	21/7	30/4	9/-3
TE 44	nicht-orthotop	18/8	19/8	1/0	16/3	17/4	1/1
TE 45	nicht-orthotop	18/8	22/9	4/1	16/3	22/4	6/1
TE 46	orthotop	16/6	17/6	1/0	18/4	21/8	3/4
TE 52	orthotop	16/9	20/11	4/2	20/3	33/11	13/9

Die oben dargestellte Tabelle 4 zeigt, dass bei dem Vergleich beider Studien-Gruppen in Bezug auf die Veränderung der Drücke im Vorhof und Ventrikel (delta P) kein wesentlicher Unterschied bestand. Eine Zunahme des systolischen Druckes im rechten Ventrikel wurde in beiden Versuchsgruppen beobachtet. Bei den orthotop platzierten Klappenstents konnten die deutlichsten Zunahmen des systolischen Drucks im rechten Ventrikel dokumentiert werden. Der rechtsatriale Druck nahm in beiden Gruppen in den meisten Fällen gering zu.

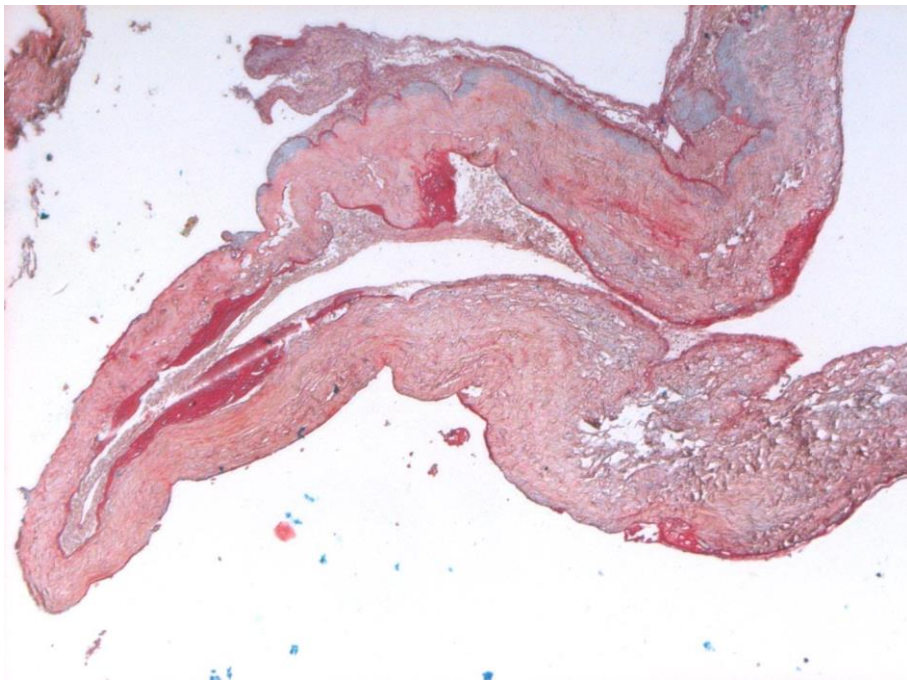


### 3.3 Histologie

#### 3.3.1 Schichtung der Herzklappen



*Abb. 23 TE 34 (O) Segel, Movat pentachrom, 20fache Vergrößerung, normale 3-Schichtung*



*Abb. 24 TE 41 (O) Segel, Movat pentachrom, 10fache Vergrößerung, normale 3-Schichtung*

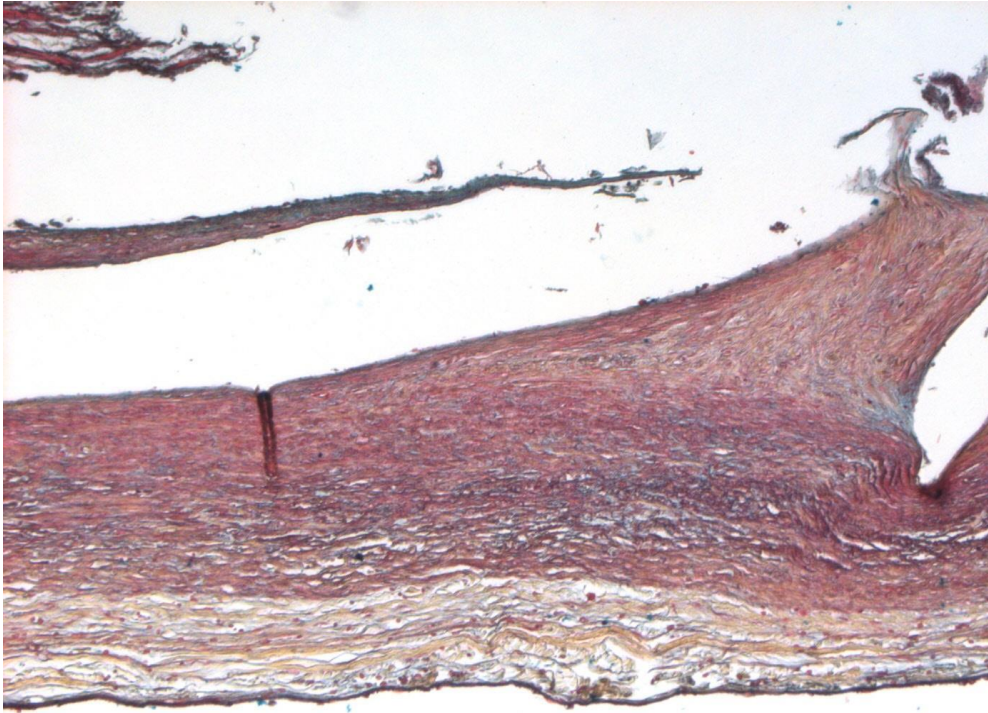


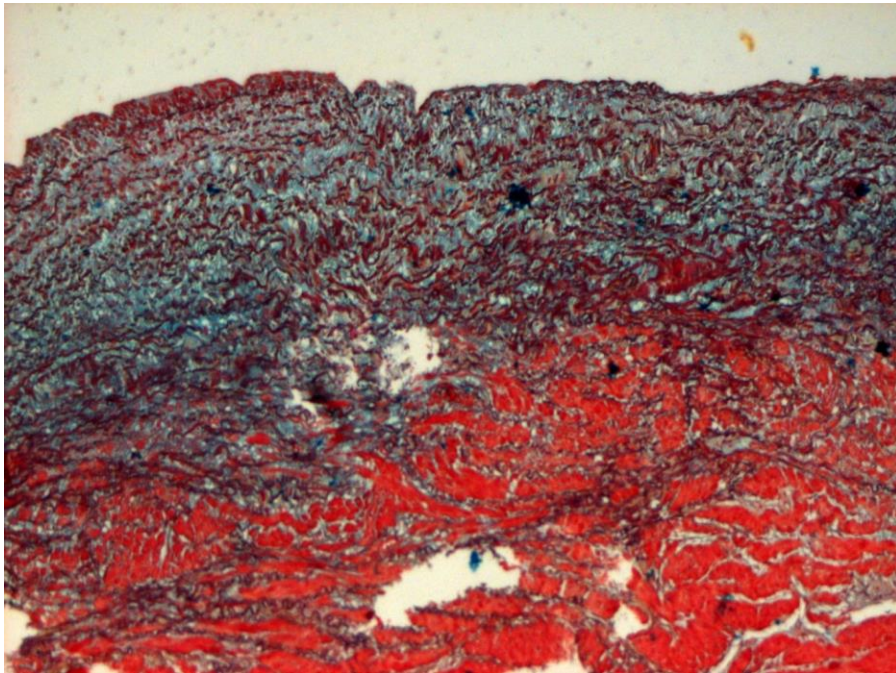
Abb. 25 TE 44 (NO) Segel, Movat pentachrom, 10fache Vergrößerung, normale 3-Schichtung

Tab. 5 Schichtdifferenzierung der Klappen

	<b>Grad 0</b> = keine Differenzierung möglich	<b>Grad 1</b> = 1 Schicht erkennbar	<b>Grad 2</b> = normale Schichtdifferenzierung
<b>Orthotope</b>	1	3	4
<b>Nicht-orthotope</b>	0	1	8

Die oben gezeigte Tabelle 5 macht deutlich, dass eine überwiegend gute Schichtdifferenzierung in beiden Versuchsgruppen vorlag. Lediglich in einem Präparat aus der Gruppe der orthotop platzierten Klappenstents konnte keine Schichtung abgegrenzt werden. Für TE 52 (orthotop), TE 35 (orthotop) und TE 45 (nicht-orthotop) lag jeweils nur ein verwertbarer histologischer Schnitt vor.

### 3.3.2 Hypertrophie/Hyperplasie



*Abb. 26 TE 34 (O), A. pulmonalis, Movat pentachrom, 10fache Vergrößerung,  
normale Gefäßarchitektur*



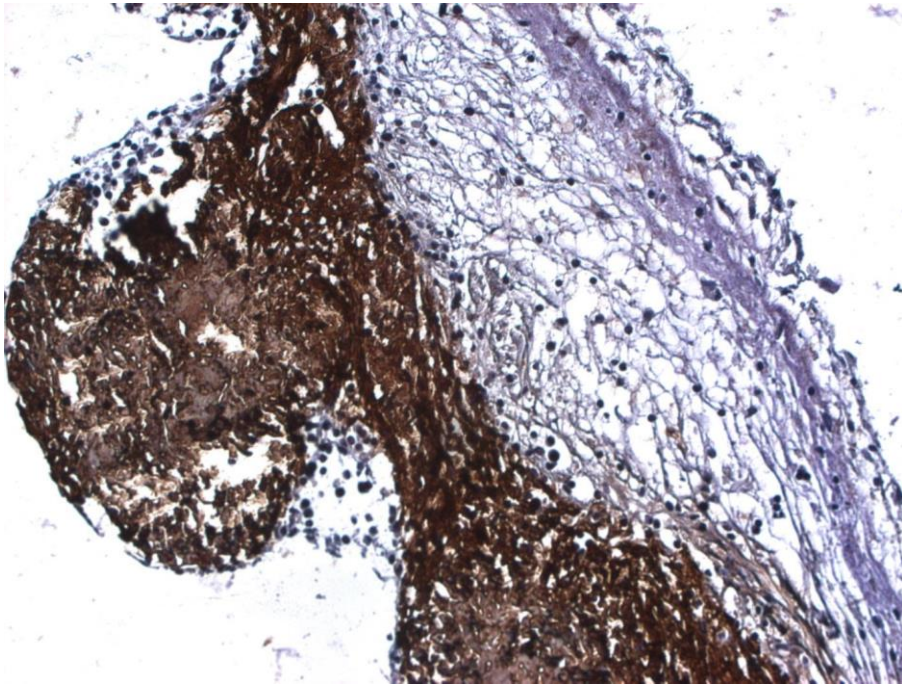
*Abb. 27 TE 33 (NO) A. pulmonalis, Movat pentachrom, 10fache Vergrößerung,  
Hyperthophie der Gefäßwandmuskulatur*

Tab. 6 Hypertrophie der Pulmonalarterie

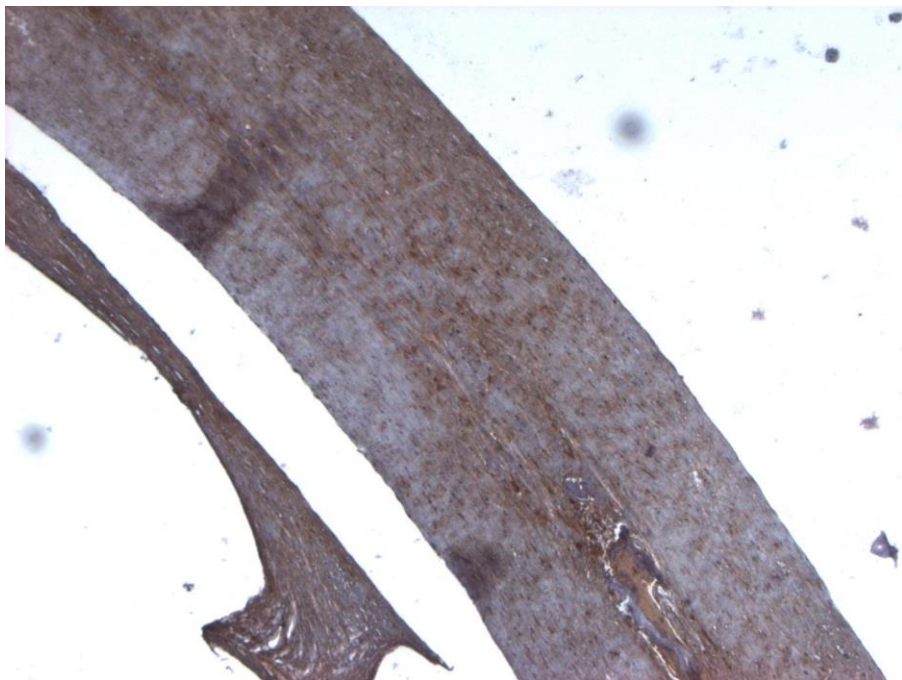
	<b>Grad 0 = normale Gefäßarchitektur</b>	<b>Grad 1 = leichte Hypertrophie</b>	<b>Grad 2 = Starke Hypertrophie bis zum Endothel</b>
<b>Orthotop</b>	6	2	0
<b>Nicht-orthotop</b>	0	4	6

In der oben dargestellten Tabelle 6 zeigt sich eine Tendenz bei den nicht-orthotop platzierten Klappenstents hin zu einer Wandhypertrophie der stenttragenden Gefäße, während der Großteil Gefäße der orthotop platzierten Klappenstents eine normale Gefäßarchitektur aufzeigte. Für TE 35 (orthotop) lagen keine Gefäßabschnitte vor.

### 3.3.3 Immunhistochemische Färbung Kollagen I



*Abb. 28 TE 46 (O) Segel, Immunhistochemie Kollagen I, 20fache Vergrößerung, normale Kollagen I Anreicherung*



*Abb. 29 TE 34 (O) Segel, Immunhistochemie Kollagen I, 10fache Vergrößerung, Unterproduktion an Kollagen I*

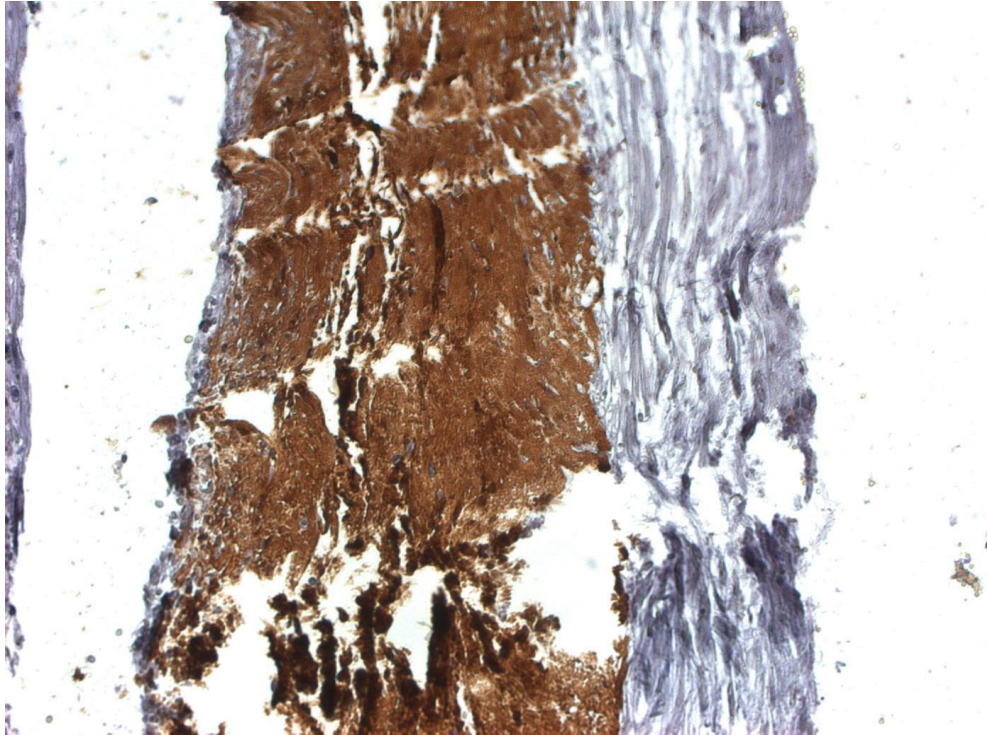


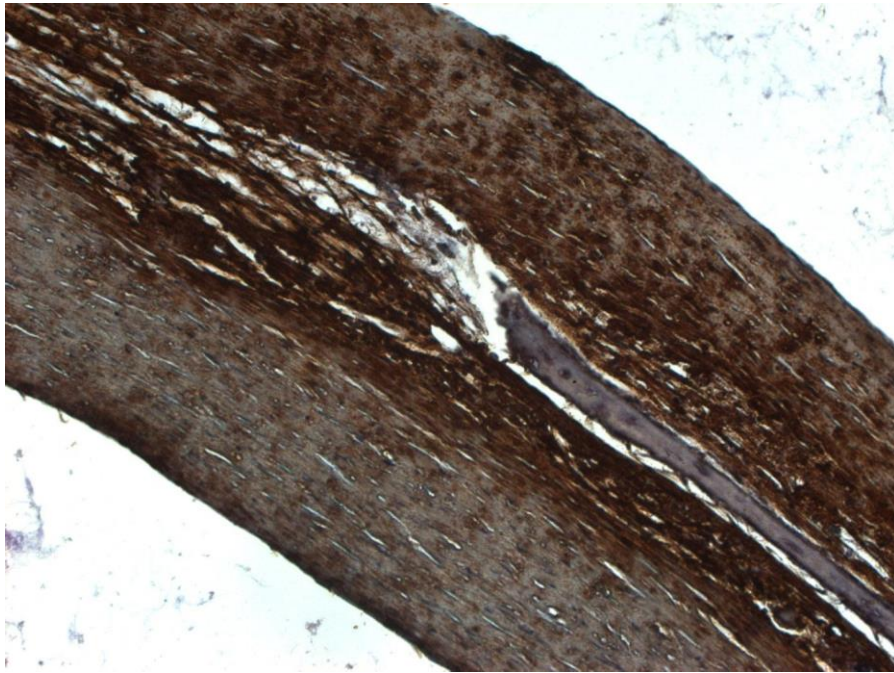
Abb. 30 TE 42 (NO) Segel, Immunhistochemie Kollagen I, 20fache Vergrößerung, normale Kollagen I Anreicherung

Tab. 7 Expression von Kollagen I der Segel

	<b>Grad 0-1 = keine bis geringe Anfärbung</b>	<b>Grad 2-3 = normal</b>	<b>Grad 4 = Überexpression</b>
<b>Orthotope</b>	3	4	2
<b>Nicht-orthotope</b>	4	5	0

In der oben dargestellten Tabelle zeigte sich kein Unterschied, ob die Lage des Klappenstents einen Einfluss auf Produktion des Kollagen I hat, wenn auch mehrere Schnitte eine Unterproduktion aufwiesen. Von TE 52 (orthotop) und TE 45 (nicht orthotop) lag nur ein Abschnitt vor.

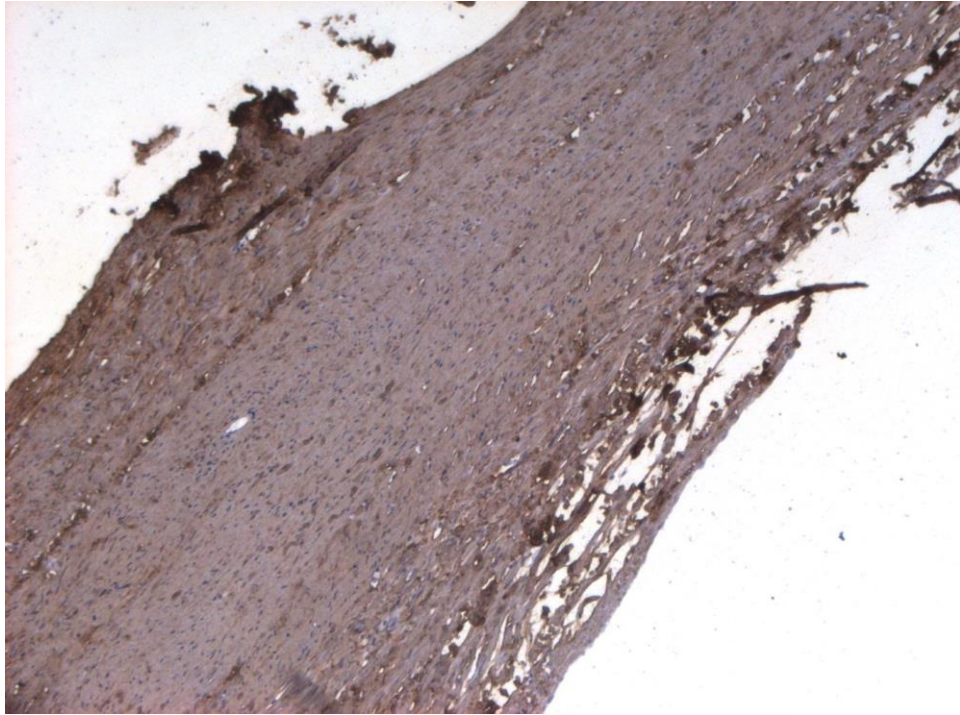
### 3.3.4 Immunhistochemische Färbung Kollagen III



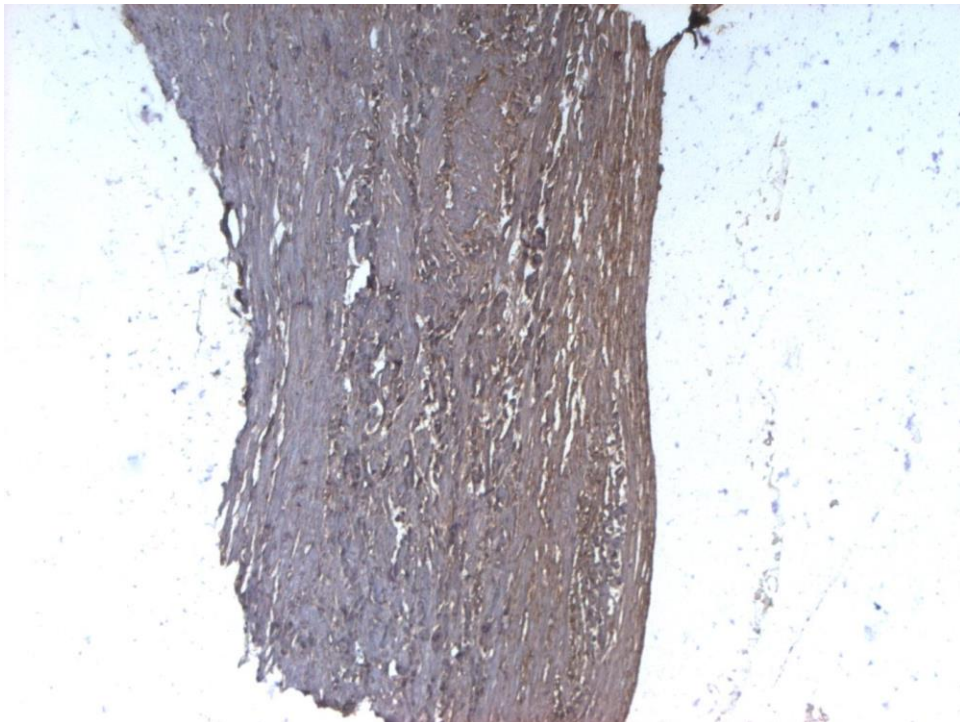
*Abb. 31 TE 34 (O) Segel, Immunhistochemie Kollagen III, 20fache Vergrößerung, kräftige Ausprägung von Kollagen III*



*Abb. 32 TE 52 (O) Segel, Immunhistochemie Kollagen III, 20fache Vergrößerung, kräftige Ausprägung von Kollagen III*



*Abb. 33 TE 44 (NO) Segel, Immunhistochemie Kollagen III, 10fache Vergrößerung, geringe Ausprägung von Kollagen III*



*Abb. 34 TE 45 (NO) Segel, Immunhistochemie Kollagen III, 10fache Vergrößerung, geringe Ausprägung von Kollagen III*

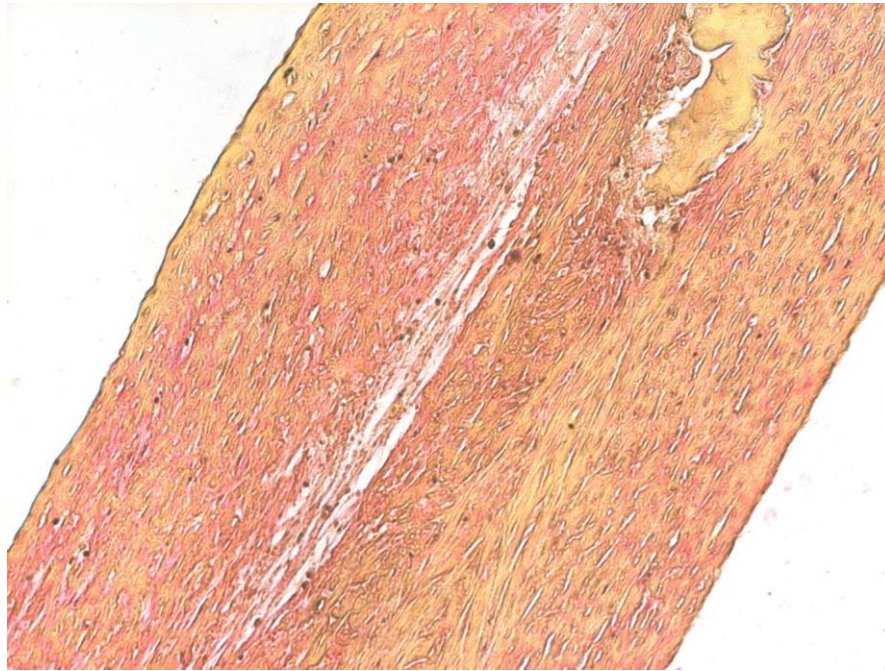


Tab. 8 Expression von Kollagen III der Segel

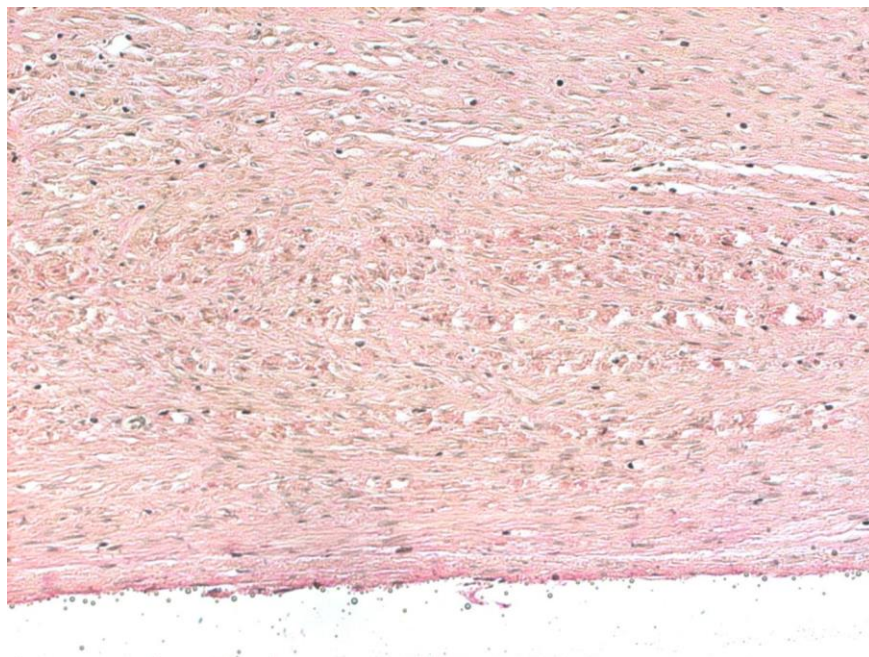
	<b>Grad 0-1 = keine bis geringe Anfärbung</b>	<b>Grad 2-3 = normal</b>	<b>Grad 4 = Überexpression</b>
<b>Orthotope</b>	1	7	2
<b>Nicht-orthotope</b>	5	3	2

In der oben gezeigten Tabelle 8 war jedoch eine Tendenz zu sehen, dass die Tissue engineerten Klappen der Klappenstents in nicht orthotoper Position offenbar zu einer Unterproduktion von Kollagen III neigten, wohingegen die Tissue engineerten Klappen der orthotop platzierte Klappenstents eine normale Produktion an Kollagen III ausbildeten.

### 3.3.5 Zellpopulation



*Abb. 35 TE 34 (O) Segel, van Gieson, 20fache Vergrößerung,  
normale, geringe Zellzahl (139 in diesem GF)*



*Abb. 36 TE 44 (NO) Segel, van Gieson, 20fache Vergrößerung,  
erhöhte Zellzahl (565 in diesem GF)*

Tab. 9 Zellanzahl in den Segeln

	<b>Grad 0</b> = normales Zellwachstum (bis 400 Zell/GF)	<b>Grad 1</b> = Hyperplasie (400- 600 Zellen/GF)	<b>Grad 2</b> = Entzündung (>600 Zellen/GF)
<b>Orthotope</b>	6	2	2
<b>Nicht-orthotope</b>	3	6	1

In der oben gezeigten Tabelle 9 lässt sich eine erhöhte Anzahl an Zellen in den Tissue engineerten Klappen der nicht-orthotop platzierten Klappenstents nachweisen.

## **Diskussion**

Die vorliegende Arbeit hat sich intensiv mit der Fragestellung auseinandergesetzt, ob eine Fehlplatzierung eines Klappenstents im Rahmen eines minimalinvasiven Herzklappenersatzes der Pulmonalklappe eine Auswirkung auf die histologische Struktur der Klappe und des umliegenden Gewebes hat. Die Arbeit ging damit aus der Arbeitsgruppe des transkatheter Herzklappenersatzes mit Tissue engineeringten Herzklappen von Prof. Dr. med. Georg Lutter hervor.

Es wurde bereits in vorausgehenden Arbeiten gezeigt, wieviel Potential der perkutane Klappenersatz mit Tissue Engineering gefertigten Herzklappen hat (Lutter et al. 2010, Metzner et al. 2010, Attmann et al. 2005). Unter der Vorstellung, eine entwicklungsfähige Herzklappe mit körpereigenem Gewebe zu implantieren, bieten sich völlig neue Therapieoptionen insbesondere bei Kindern und Jugendlichen mit angeborenen Herzfehlern an, da diese im Erwachsenenalter bei komplexen Voroperationen im Kindesalter deutlich schwieriger zu operieren sind und Rezidiveingriffe mehr Komplikationen mit sich bringen (Warnes et al. 2001).

### **4.1 Tissue Engineering - Stand der Dinge**

Der Begriff Tissue Engineering wurde vermutlich im Rahmen eines Vortrags der National Science Foundation in Washington DC im Jahre 1987 das erste Mal erwähnt (Heinken und Skalak 1991). Bereits im folgenden Jahr wurde von einer Forschungsgruppe eine Definition des Tissue Engineering publiziert (Skalak und Fox 1988). Eine weiterhin aktuelle Definition hat Nerem gegeben: "Tissue engineering is the application of the principles and methods of engineering and the life sciences towards the development of biological substitutes to restore, maintain or improve functions" (Nerem 1992). Hieraus wird deutlich, dass diese TE-Gewebe nicht nur einen einfachen Organersatz darstellen oder eine Funktion ersetzen, sondern sogar eine Verbesserung des Primärgewebes zum Ziel haben. Dabei kann das Tissue Engineering sich auf verschiedenste Organe beziehen - nicht nur, wie in dieser Arbeit behandelt, auf Herzklappen. Eine Arbeitsgruppe hat beispielsweise Zellen der Schilddrüse mittels Tissue Engineering reproduziert, um den postoperativen Hypothyreodismus zu behandeln (Arauchi et al. 2009). Andere Arbeitsgruppen haben nicht nur zum Ziel, ein funktionsfähiges Gewebe herzustellen und zu implantieren, sondern ganze Organe im Labor anzuzüchten, um einen Organersatz ohne Organspender zu ermöglichen (Mazza et al. 2017).

Der Ersatz von Herzklappen beschränkt sich aktuell auf mechanische Klappen und Xenografts und stellen die Medizin vor unterschiedliche Probleme. Mechanische Klappen benötigen weiterhin eine lebenslange Antikoagulation und sind als Fremdkörper anfällig für Infektionen. Biologische Herzklappen haben in der Regel nur eine begrenzte Lebensdauer, sodass eine erneute Operation notwendig wird. Daher werden häufig Patienten im hohen Alter, bei denen die Lebensdauer der Herzklappe die Lebenszeit des Patienten vermutlich übersteigen wird, mit einer biologischen Klappe versorgt oder auch, wenn Kontraindikationen gegen die Antikoagulation bestehen (Horstkotte 1989). Gerade bei Patienten im Kindesalter mit angeborenem Herzfehler, bei denen sich die implantierten Gewebe nicht regenerieren und mitwachsen können, wird eine erneute Operation mit erhöhter Morbidität und Mortalität notwendig (Mirensky et al. 2010).

Einer der sicherlich interessantesten Aspekte des Tissue Engineering ist, gerade im Hinblick auf den Herzklappenersatz, dass eine neue, lebende Klappe mit Wachstumspotential implantiert wird und nicht wie bisher eine leblose, mechanische Klappe aus synthetisiertem Material oder Xenografts mit einer begrenzten Lebensdauer (Vesely 2005).

Tissue Engineering baut auf drei Säulen auf: Den kultivierten Zellen, dem Träger und dem Anzüchtungsverfahren (Meinel et al. 2004). Schließlich gibt es unterschiedliche Arten der Implantation. Diese reichen von offenen Operationen bis hin zu minimalinvasiven Ansätzen. Die Gewinnung der Zellen kann auf unterschiedlichstem Wege erfolgen. In dieser Studie wurden die Zellen mittels Knochenmarkpunktion oder aus Endothelien von Arterien gewonnen. Andere Forschungsgruppen haben die Zellen beispielsweise aus Venen gewonnen (Aleksieva et al. 2012). Gerade die CD133+ Zellen des Knochenmarks haben sich als hervorragende Zellen für das Tissue Engineering von Herzklappen herausgestellt (Boldt et al. 2013).

Auch die Rohlinge, auf denen die Zellen aufgetragen werden, spielen eine entscheidende Rolle und es wurde sowohl mit synthetischen als auch biologischen Materialien experimentiert (Shinoka et al. 1995). Die synthetischen Materialien haben jedoch zu einer toxischen Degeneration geführt und haben inflammatorische Prozesse ausgelöst, welche zusammen vermutlich den Abbau von synthetischem Material und Aufbau von Matrixproteinen verhindert haben (Dohmen et al. 2003). Bei den biologischen Rohlingen wurden zunächst normale Bioklappenprothesen mit Endothelzellen versetzt, jedoch konnte sich kein durchgehendes Endothel auf den Klappen bilden (Bengtsson et al. 1993). Doch genau dieses Endothel auf der Klappenoberfläche wirkt als physiologische Barriere und

schützt die Klappe vor degenerativem Umbau und Kalzifizierung der Klappenmatrix (Ishihara et al. 1981, Liao et al. 1993). Ein dezellularisiertes Gerüst einer Schweineherzklappe wurde 1999 von O'Brien et al. vorgestellt (O'Brien et al. 1999). Diese Methode wurde weiter verfeinert und in den meisten Arbeiten haben sich die dezellularisierten Xenograftgerüste als Basis durchgesetzt (Lichtenberg et al. 2006). Die Dezellularisierung spielt dabei eine wichtige Rolle und wurde ebenfalls weiter erforscht und optimiert (Tudorache et al. 2007). Diese erfolgt heute meistens nach grober Entfernung von Gewebe mit einem Gemisch aus EDTA und Trypsin.

Grundlage für die Herstellung eines Gewebes ist die Kultivierung von Zellen *in vitro*. Die Idee der extrakorporalen Zellanzüchtung stammt aus dem Jahre 1898, in dem C. Ljunggren Epithelzellen in Kulturmedien vital gehalten hat (Ljunggren 1898). Ein tatsächliches Zellwachstum wurde erstmals in einer Publikation 1910 beobachtet (Harrison 1910). Heute stellt die *in vitro* Kultivierung von Zellen eher eine Standardprozedur dar. Sie findet Anwendung in vielen Bereichen der Medizin, beispielsweise der Mikrobiologie, Humangenetik und reproduktiven Medizin. Eine Weiterentwicklung dieser *in vitro* Kultivierung stellt der Bioreaktor dar, bei dem die Zellen nicht nur auf einem statischen Medium angezüchtet werden, sondern nach dem Auftragen auf den Klappenrohling weiter in ihrem Wachstum angeregt werden. Dabei werden durch den Bioreaktor physiologische Bedingungen simuliert (Barzilla et al. 2010, Aleksieva et al. 2012).

Für die präklinische Forschung haben sich Schafe als ideales Versuchstier etabliert, da die Anatomie ihres Herzens der des Menschen sehr nahe kommt (Ali et al. 1996). Bei den meisten Publikationen zum Thema Tissue Engineering mit Herzklappen wurden bei Tierexperimenten daher Schafe verwendet (Dohmen et al. 2003, Lichtenberg et al. 2006, Lutter et al. 2010, Theodoridis et al. 2017).

Als Implantationsmethode wurde in der hier vorgestellten Forschungsgruppe von Prof. Lutter der minimalinvasive Ansatz gewählt. Die Klappe wird mit Hilfe eines selbstexpandierenden Klappenstents über die Leistengefäße kathetergesteuert transluminal implantiert. Gerade im Hinblick auf jüngere Patienten, die von dem gesamten Konzept einer TE-Herzklappe profitieren würden, stellt diese Methode eine hervorragende Alternative zur maximal invasiven Operation am offenen Herzen dar. Sie passt darüber hinaus in das Konzept einer schonenden, medikamentenarmen bis -freien Behandlung mit einer

Herzklappe, die mit dem Patienten mit wächst, weshalb sich eine erneute Operation erübrigt. Es wurden bereits klinische Einsätze bei Menschen von Tissue engineerter Geweben publiziert (Neumann et al. 2013). Die Universitätsklinik Hannover bietet ihren Patienten bereits einen Herzklappenersatz mit Tissue engineerter Herzklappen an (Medizinische Hochschule Hannover 2014).

## **4.2 Die Platzierung der Klappenstents**

Die abschließende Einteilung, welche Klappenstents orthotop und welche nicht-orthotop platziert wurden, erfolgte anhand der makroskopischen Analyse der explantierten Herzen. Lediglich in 2 Fällen kam es zu einer massiven Dislokation im Sinne eines NOSP Typ 2. In zwei Fällen wurde ein zweiter Klappenstent implantiert. Jedoch lässt sich an den Angaben im Millimeterbereich im Bezug auf die korrekte Platzierung erkennen, wie wichtig die korrekte Platzierung ist. Denn diese wenigen Millimeter können den Unterschied ausmachen, ob der platzierte Klappenstent die nativen Klappen noch abdeckt oder, ob der Klappenstent so weit in den Ventrikel hinein ragt, dass die Ventrikelwand beschädigt wird. Dieser Umstand zeigt, wie wichtig es ist, bessere Systeme zur Platzierung oder Korrekturmöglichkeiten zu entwickeln und zu produzieren.

Für den klinischen Alltag wird die Angabe von Rauten zur Beurteilung einer orthotopen oder nicht-orthotopen Platzierung des Klappenstents und Einteilung in die NOSP-Klassifikation effektiver sein, da diese in der Fluoroskopie besser zu beurteilen sind als Millimeterangaben.

## **4.3 Histologische Untersuchungen**

### **4.3.1 Schichtung der Herzklappen**

Eine grundsätzliche morphologische Störung der histologischen Architektur konnte in keiner der beiden Studien-Gruppen nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass eine Fehlplatzierung keine Auswirkung auf grundlegende Entwicklung des Organs hat. Somit zeigt sich, dass Herzklappen, welche mittels Tissue Engineering hergestellt wurden und nicht unter optimalen Bedingungen sich entwickeln, trotzdem eine für dieses Organ normale Architektur bilden können. Lediglich in der Ausbildung der einzelnen Komponenten gibt es Abweichungen (beispielsweise Zellpopulation und Kollagen III). Die grundlegende Struktur entwickelt sich jedoch normal.

### **4.3.2 Gefäßwandhypertrophie**

Die Gefäßwand der Pulmonalarterie in dem Bereich, wo der Klappenstent implantiert wurde, zeigte bei den nicht-orthotop platzierten Klappenstents eine Gefäßwandhypertrophie. Eine Hypertrophie stellt eine Reaktion auf eine veränderte, zumeist Mehrbelastung durch Druck eines Gefäßes dar (Heath 1973). Die Ergebnisse aus 3.2 haben keine dazu passenden Ergebnisse erbracht, die Erhöhung des systolischen rechtsventrikulären Drucks war in der Versuchsreihe der orthotop platzierten Klappenstents teilweise sogar höher. Jedoch ist davon auszugehen, dass die Fehlplatzierung andere Faktoren, die in dieser Studie nicht erfasst wurden, wie z.B. Verwirbelungen des Blutes oder Scherkräfte, zur Folge hat und verantwortlich ist für die Hypertrophie der Gefäßwand.

### **4.3.3 Kollagengehalt der Herzklappen**

In den Versuchsgruppen ließ sich in Bezug auf die Produktion des Kollagen I kein signifikanter Unterschied feststellen. Das wichtigste und strukturbildende Kollagen ist jedoch das Kollagen III (White et al. 2010). Hier konnte eine normale Produktion in den Herzklappen festgestellt werden, die orthotop platziert wurden. Dagegen kam es zu einer Unterproduktion an Kollagen III in den nicht-orthotop platzierten Klappen. Es lässt sich also vermuten, dass eine korrekte Platzierung sich positiv auf die Entwicklung der Klappen auswirkt bzw. eine Fehlplatzierung des Klappenstents, mit ihren hämodynamischen Auswirkungen, auch wenn hier nicht unmittelbar der systolische und diastolische Druck eine größere Rolle zu spielen scheinen, die Produktion von Kollagen III und damit der Widerstandskraft der Klappe schadet.

### **4.3.4 Zellpopulation der Herzklappen**

Fehlplatzierte Klappen neigen offensichtlich zu einer vermehrten Zellpopulation, wobei die Extrazellulärmatrix, wie oben beschrieben, eher unterentwickelt zu sein scheint. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine pathologische Hyperplasie oder um eine entzündliche Reaktion mit Invasion von Entzündungszellen handelt (Bianchi und Riede 2004, Hascoet et al. 2017).



## **4.4 Limitationen der Studie**

Die Studie erfolgte am Tiermodell. Auch wenn Schafe ein sehr praktisches und den anatomischen Verhältnissen des Menschen vergleichbares Versuchstier darstellen, so können Aussagen über die tatsächlichen Auswirkungen unserer künftigen Patienten nur bedingt getroffen werden, da es sich nach wie vor um einen Tierversuch handelt. Es wurden zudem auch in zwei Fällen zwei Klappenstents implantiert. Ein homogeneres Kollektiv würde nur Versuchstiere mit einem implantierten Klappenstent umfassen.

Zudem ist die Anzahl der Versuchstiere klein. Eine bessere Aussagefähigkeit über die Langzeitfolgen einer Fehlplatzierung könnte nur durch deutlich mehr Versuchstiere und längere Versuchszeitfenster erreicht werden. Daher wurde auch auf die Durchführung einer statistischen Analyse verzichtet.

Aufgrund der teilweise aufgetretenen Verkalkungen der Klappen sowie des geringen Materials konnten bei manchen Versuchstieren nur ein Schnitt pro Färbung gewonnen werden. Materialproben der Pulmonalarterie des Versuchstiers TE 35 waren leider nicht vorhanden.

## **4.5 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die Untersuchung hat ergeben, dass eine Fehlplatzierung des Klappenstents die Herzklappe in ihrer Strukturgebung und Widerstandskraft schädigt. Insbesondere das wichtigste strukturgebende Protein Kollagen Typ III wird in den fehlplatzierten Klappen nicht ausreichend ausgebildet. Da Kollagen III eine der wichtigsten Rollen in der Entwicklung, Funktion und Langlebigkeit der Klappen darstellt (White et al. 2010), kann davon ausgegangen werden, dass eine Unterproduktion an Kollagen III in einer Instabilität und geringeren Lebensdauer der Klappen mündet. Gerade bei Herzklappen, welche mittels Tissue Engineering sich in einem Entwicklungsprozess in vivo befinden, sollten also die bestmöglichen Voraussetzungen gegeben sein, damit eine Klappe in ihrer Entwicklung sich zu dem gewünschten normalen bzw. an die Grundvoraussetzungen des Herzens angepasste System entwickeln kann und von langer Lebensdauer ist. Ebenso konnte eine vermehrte Belastung der Pulmonalarterie durch die Fehlplatzierung gezeigt werden. Diese Veränderungen lassen sich nicht mit einem Druckunterschied erklären, daher ist davon auszugehen, dass diese histologischen Veränderungen durch andere Faktoren hervorgerufen werden, die in dieser Studie nicht erfasst wurden. Denkbar wären veränderte Scherkräfte oder Verwirbelungen des Blutes. Diese Faktoren zu identifizieren und ggf. diesen auch durch

Innovationen zu begegnen sind Bestandteil künftiger Forschungen.

Jedoch konnte die Arbeit auch zeigen, dass eine TE-Herzklappe selbst unter erschwerten Bedingungen in der Lage ist, sich zumindest von der grundlegenden Struktur zu entwickeln, was für die verwendeten Verfahren des Tissue Engineerings der Versuchsgruppe spricht. Somit konnte gezeigt werden, wie wichtig die korrekte Platzierung eines Klappenstents in der minimalinvasiven Herzklappenchirurgie ist. Daher sollten in Zukunft Systeme entwickelt werden, welche eine korrekte Platzierung der Klappenstents ermöglichen, insbesondere, da eine Lagekorrektur mit den derzeitigen Möglichkeiten nahezu ausgeschlossen ist und sogar Schädigungen bis hin zu gefährlichen Verletzungen der Pulmonalarterie mit letalen Folgen führen kann.

Ich vermute, dass die Fähigkeit der Lagekorrektur bei einem Klappenstent, in den zudem eine neue Herzklappe eingenäht wurde, die mechanischen Fähigkeiten der derzeitigen Modelle übersteigt und bei einem besseren Platzierungssystem ebenfalls überflüssig sein würde.

Die histologische Aufarbeitung der Herzklappen der korrekt platzierten Klappenstents hat gezeigt, dass schon heute TE-Herzklappen in vivo sich gut entwickeln können und eine interessante und aus physiologischen Gesichtspunkten erfolgversprechende Alternative zu synthetischen oder xenotransplantierten Klappen darstellen. Jedoch sollte bedacht werden, dass Studien, die einen routinierten klinischen Einsatz begründen könnten, noch viele Jahre in Anspruch nehmen werden (Vesely 2005).

Auch der minimalinvasive Herzklappenersatz konnte in der Untersuchung mit seiner guten Durchführbarkeit und geringen Belastung für die Versuchstiere überzeugen. Für nähere Ergebnisse diesbezüglich möchte ich auf die Arbeiten von Lutter und Kollegen verweisen (Lutter et al. 2010, Boldt et al. 2013, Metzner et al. 2010, Attmann et al. 2006).

# **Zusammenfassung**

## **Einleitung**

Die Forschungsgruppe von Prof. Dr. med. Georg Lutter verfolgt einen minimalinvasiven, perkutan-transluminalen Ersatz der Pulmonalklappe mit einer Tissue engierten Herzklappe in einem selbstexpandierendem Klappenstent im Schafmodell. Diese Arbeit untersuchte die histologischen Auswirkungen einer nicht-orthotopen Platzierung im Vergleich zu orthotop platzierten Klappenstents.

## **Material und Methoden**

In 5 Fällen war die Position postinterventionell orthotop, in 5 Fällen nicht-orthotop. Der Untersuchungszeitraum betrug 3-5 Monate. Die histologische Architektur, die Zellzahl sowie der Gehalt an Kollagen I und III wurden mit Färbungen nach Movat-Pentachrom, van Gieson und immunhistochemischen Färbungen von Kollagen I und III untersucht. Die Färbungen der Pulmonalarterie im Bereich des Stentbetts mit Movat-Pentachrom erfolgte zur Darstellung von myokardialen Hypertrophien.

## **Ergebnisse**

Die grundlegende Klappenarchitektur sowie der Gehalt an Kollagen I war in beiden Versuchsgruppen nicht verschieden. Der Gehalt des wichtigsten strukturgebenden Proteins Kollagen III war in den fehlplatzierten Klappen geringer ausgeprägt, zudem war in diesen Klappen die Zellzahl wie bei einer Entzündung oder Hyperplasie erhöht. Ähnlich einer hypertensiven Erkrankung reagieren die Pulmonalarterien zu einer Hypertrophie der Tunica media bei fehlplatzierten Klappenstents.

## **Schlussfolgerung**

Eine Fehlplatzierung des Klappenstents hat also unmittelbare Auswirkungen auf die Histologie der Klappen und der Pulmonalarterie. Es lässt sich schlussfolgern, dass sich eine Unterproduktion des wichtigsten Strukturproteins Kollagen III negativ auf die Langlebigkeit der Klappe auswirkt. Somit ist eine korrekte Platzierung des Klappenstents von enormer Bedeutung für das Überleben unserer künftigen Patienten. Die Verbesserung des Platzierungssystems und/oder eine Korrekturmöglichkeit nach Expansion sind somit von großem Interesse und damit Ziel künftiger Forschungen im minimalinvasiven Klappenersatz.

## Literatur

Aleksieva, G., Hollweck, T., Thierfelder, N., Haas, U., Koenig, F., Fano, C., Dauner, M., Wintermantel, E., Reichart, B., Schmitz, C., Akra, B. (2012): Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering. *Biomed. Eng. Online*, 11:92

Ali, M. L., Kumar, S. P., Bjornstad, K., Duran, C. M. (1996): The sheep as an animal model for heart valve research. *Cardiovasc. Surg*, 4 (4), 543–549

Arauchi, A., Shimizu, T., Yamato, M., Obara, T., Okano, T. (2009): Tissue-engineered thyroid cell sheet rescued hypothyroidism in rat models after receiving total thyroidectomy comparing with nontransplantation models. *Tissue Eng. Pt. A*, 15(12):3943-9

Attmann, T., Jahnke, T., Quaden, R., Boening, A., Muller-Hulsbeck, S., Cremer, J., Lutter, G. (2005): Advances in experimental percutaneous pulmonary valve replacement. *Ann. Thorac. Surg*, 80 (3), 969–975

Attmann, T., Quaden, R., Freistedt, A., König, C., Cremer, J., Lutter, G. (2007): Percutaneous heart valve replacement: histology and calcification characteristics of biological valved stents in juvenile sheep. *Cardiovasc. Pathol*, 16 (3), 165–170

Attmann, T., Quaden, R., Jahnke, T., Muller-Hulsbeck, S., Boening, A., Cremer, J., Lutter, G. (2006): Percutaneous pulmonary valve replacement: 3-month evaluation of self-expanding valved stents. *Ann. Thorac. Surg*, 82 (2), 708–713

Barron, V., Lyons, E., Stenson-Cox, C., McHugh, P. E., Pandit, A. (2003): Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review. *Ann. Biomed. Eng*, 31 (9), 1017–1030

Bengtsson, L., Radegran, K., Haegerstrand, A. (1993): In vitro endothelialization of commercially available heart valve bioprostheses with cultured adult human cells. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*, 7(8), 393-8

Bethge, J. (2008): Perkutaner Pulmonalklappenersatz und Tissue Engineering: Die Herstellung und Charakterisierung selbstexpandierender klappentragender Stens auf der Basis eines dezellularisierten Klappengerüsts. *Med. Diss., Kiel*

Bianchi, L., Riede, U.-N. (2004): Allgemeine und spezielle Pathologie. 168 Tabellen. Thieme. Stuttgart

Boldt, J., Lutter, G., Pohanke, J., Fischer, G., Schoettler, J., Cremer, J., Metzner, A. (2013): 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*, 19 (5), 363–374

Bonhoeffer, P., Boudjemline, Y., Saliba, Z., Merckx, J., Aggoun, Y., Bonnet, D., Acar, P., Le Bidois, J., Sidi, D., Kachaner, J. (2000): Percutaneous replacement of pulmonary valve in a right-ventricle to pulmonary-artery prosthetic conduit with valve dysfunction. *The Lancet*, 356 (9239), 1403–1405

Borik, S., Crean, A., Horlick, E., Osten, M., Lee, K.-J., Chaturvedi, R., Friedberg, M.K., McCrindle, B.W., Manliot, C., Benson L. (2015): Percutaneous pulmonary valve implantation: 5 years of follow-up: does age influence outcomes? In: *Circulation. Circ Cardiovasc Interv*, 8 (2), e001745

Barzilla, J.E., McKenney, A.S., Cowan, A.E., Durst, C.A., Grande-Allen, K.J. (2010): Design and validation of a novel splashing bioreactor system for use in mitral valve organ culture. *Ann. Biomed. Eng.*, 38(11), 3280-94

Bruch, H.-P., Trentz, O., Berchtold, R., Hamelmann, H., Peiper, H.-J. (2008): *Berchtold Chirurgie*. Elsevier, Urban & Fischer, München

Cohn, L. H. (2012): *Cardiac surgery in the adult*. McGraw-Hill Medical, New York

Combs, M. D., Yutzey, K. E. (2009): Heart valve development: regulatory networks in development and disease. *Circ. res.*, 105 (5), 408–421

Cribier, A., Eltchaninoff, H., Bash, A., Borenstein, N., Tron, C., Bauer, F., Derumeaux, G., Anselme, F., Laborde, F., Leon, M.B. (2002): Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation*, 106 (24), 3006–3008

Dohmen, P. M., Ozaki, S., Nitsch, R., Yperman, J., Flameng, W., Konertz, W. (2003): A tissue engineered heart valve implanted in a juvenile sheep model. *Med. Sci. Monit*, 9 (4), BR97-BR104

Filip, D. A.; Radu, A.; Simionescu, M. (1986): Interstitial cells of the heart valves possess characteristics similar to smooth muscle cells. *Circ. res*, 59 (3), 310–320

Flanagan, T. C., Pandit, A. (2003): Living artificial heart valve alternatives: a review. *Eur. Cell Mater*, 6, 28–45

Fleck, E. (2014): Herzmedizin-Fortschritte: Sterblichkeit nimmt weiter ab, immer bessere Versorgung. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. Neuer Deutscher Herzbericht

Frigiola, A., Nordmeyer, J., Bonhoeffer, P. (2009): Percutaneous pulmonary valve replacement. *Coron. Artery Dis*, 20 (3), 189–191

Gross, L., Kugel, M. A. (1931): Topographic Anatomy and Histology of the Valves in the Human Heart. *Am. J. Pathol*, 7 (5), 445-474.7

Harrison, R.G. (1910): The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic extension. *J. Exp. Zool*, 9, 787–846

Hascoet, S., Mauri, L., Claude, C., Fournier, E., Lourtet, J. Riou, J.-Y., Brenot P., Petit J. (2017): Infective Endocarditis Risk After Percutaneous Pulmonary Valve Implantation With the Melody and Sapien Valves. *JACC. Cardiovascular interv*, 10 (5), 510–517

Heath, D. (1973): The Histological Features and Physical Characteristics of the Pulmonary Trunk at High Altitude. *Pathol Microbio*, 39 (3), 266–269

Heinken, F.G., Skalak, R. (1991): Tissue Engineering: A brief overview. *J Biomech Eng* 113(2), 111-112

Horstkotte, D. (1989): Herzklappenersatz — Indikationen, Komplikationen, Langzeitprognose. In: Miehke, K. (Hrsg.) *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin*, Bd. 95 S. 274-275, Springer, Berlin, Heidelberg

Ishihara, T., Ferrans, V.J., Jones, M., Boyce, S.W., Roberts, W.C. (1981): Occurrence and significance of endothelial cells in implanted porcine bioprosthetic valves. *Am. J. Cardiol*, 48(3), 443-54

Jana, S., Tranquillo, R. T., Lerman, A. (2016): Cells for tissue engineering of cardiac valves. *J. Tissue Eng. Regen. Med*, 10 (10), 804–824

Kapanci, Y. (1965): Hypertensive pulmonary vascular disease. Endothelial hyperplasia and its relations to intravascular fibrin precipitation. *Am. J. Pathol*, 47 (4), 665–676

Liao, K., Gong, G., Hoffman, D., Seifert, E., Factor, S.M., Macaluso, F., Frater, R.W. (1993): Spontaneous host endothelial growth on bioprosthetic valves and its relation to calcification. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*, 7(11), 591-6

Lichtenberg, A., Tudorache, I., Cebotari, S., Suprunov, M., Tudorache, G., Goerler, H., Park, J.K., Hilfiker-Kleiner, D., Ringes-Lichtenberg, S., Karck, M., Brandes, G., Hilfiker, A., Haverich, A. (2006): Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation*, 114 (1 Suppl), I559-65

Ljunggren, C.A. (1898): Von der Fähigkeit des Hautepithels, ausserhalb des Organismus sein Leben zu behalten, mit Berücksichtigung der Transplantation. *Dtsch. Z. Chir*, 47, 608–615

Lutter, G., Metzner, A., Jahnke, T., Bombien, R., Boldt, J., Iino, K., Cremer J., Stock U.A. (2010): Percutaneous tissue-engineered pulmonary valved stent implantation. *Ann. Thorac. Surg*, 89 (1), 259–263

Mazza, G., Al-Akkad, W., Rombouts, K., Pinzani, M. (2017): Liver tissue engineering: From implantable tissue to whole organ engineering. *Hepatol. Commun*, 2(2), 131-141

Medizinische Hochschule Hannover (2014): Herzklappenchirurgie, [online] <https://www.mh-hannover.de/klappenchirurgie.html> [17.12.2018]

Meinel, L., Karageorgiou, V., Fajardo, R., Snyder, B., Shinde-Patil, V., Zichner, L., Kaplan, D., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G. (2004): Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann. Biomed. Eng.*, 32(1), 112-22

Merryman, W. D., Youn, I., Lukoff, H. D., Krueger, P. M., Guilak, F., Hopkins, R.A., Sacks, M. S. (2006): Correlation between heart valve interstitial cell stiffness and transvalvular pressure: implications for collagen biosynthesis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 290 (1), H224-31

Metzner, A., Stock, U. A., Iino, K., Fischer, G., Huemme, T., Boldt, J., Braesen, J.H., Bein, B., Renner, J., Cremer, J., Lutter, G. (2010): Percutaneous pulmonary valve replacement: autologous tissue-engineered valved stents. *Cardiovasc. Res.*, 88 (3), 453–461

Mirensky, T. L., Hibino, N., Sawh-Martinez, R. F., Yi, T., Villalona, G., Shinoka, T., Breuer, C. K. (2010): Tissue-engineered vascular grafts: does cell seeding matter? *J. Pediatr. Surg.*, 45 (6), 1299–1305

Misfeld, M., Sievers, H. (2007): Heart valve macro- and microstructure. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 362 (1484), 1421–1436

Neumann, A., Cebotari, S., Tudorache, I., Haverich, A., Sarikouch, S. (2013): Heart valve engineering: decellularized allograft matrices in clinical practice. *Biomed. Tech.*, 58(5), 453-6

Nerem, R.M. (1992): Tissue engineering in the USA. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 30(4), CE8-12

O'Brien, M.F., Goldstein, S., Walsh, S., Black, K.S., Elkins, R., Clarke, D. (1999): The SynerGraft valve: a new acellular (nongluteraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 11(4), 194-200



Perrotta, I., Russo, E., Camastra, C., Filice, G., Di Mizio, G., Colosimo, F., Ricci, P., Tripepi, S., Amorosi, A., Triumbari, F., Donato, G. (2011): New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review. *Histopathology*, 59 (3), 504–513

Rabkin-Aikawa, E., Farber, M., Aikawa, M., Schoen, F. J. (2004): Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J. Heart Valve Dis*, 13 (5), 841–847

Rabkin-Aikawa, E., Mayer, J. E., Schoen, F. J. (2005): Heart valve regeneration. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, 94, 141–179

Renz-Polster, H., Krautzig, S. (2008): *Basislehrbuch innere Medizin. Kompakt, greifbar, verständlich.* Elsevier, Urban & Fischer, München

Romeis, B., Mulisch, M., Welsch, U. (2010): *Romeis Mikroskopische Technik.* Springer, Dordrecht

Schenke-Layland, K., Riemann, I., Opitz, F., König, K., Halbhuber, K. J., Stock, U. A. (2004): Comparative study of cellular and extracellular matrix composition of native and tissue engineered heart valves. *Matrix Biol*, 23 (2), 113–125

Sellaro, T. L., Hildebrand, D., Lu, Q., Vyavahare, N., Scott, M., Sacks, M. S. (2007): Effects of collagen fiber orientation on the response of biologically derived soft tissue biomaterials to cyclic loading. *J. Biomed. Mater. Res*, 80 (1), 194–205

Shinoka, T., Breuer, C.K., Tanel, R.E., Zund, G., Miura, T., Ma, P.X., Langer, R., Vacanti, J.P., Mayer, J.E. Jr. (1995): Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann. Thorac. Surg*, 60(6), 513-6.

Skalak, R., Fox, C.F. (1988): *Tissue engineering.* Liss, New York, 26-29

Soler-Soler, J., Galve E. (2000): Valve disease: worldwide perspective of valve disease. *Heart*, 83 (6), 721–725

Stephens, E. H., Grande-Allen, K. J. (2007): Age-related changes in collagen synthesis and turnover in porcine heart valves. *J. Heart Valve Dis*, 16 (6), 672–682

Stock, U. A., Vacanti, J. P., Mayer Jr, J E, Wahlers, T. (2002): Tissue engineering of heart valves -- current aspects. *Thorac. Cardiovasc. Surg*, 50 (3), 184–193

Theodoridis, K., Tudorache, I., Cebotari, S., Calistru, A., Meyer, T., Sarikouch, S., Bara, C., Haverich, A., Hilfiker, A. (2017): Six-Year-Old Sheep as a Clinically Relevant Large Animal Model for Aortic Valve Replacement Using Tissue-Engineered Grafts Based on Decellularized Allogenic Matrix. *Tissue Eng. Pt. C-Meth*, 23(12), 953-963

Tudorache, I., Cebotari, S., Sturz, G., Kirsch, L., Hurschler, C., Hilfiker, A. Haverich, A., Lichtenberg, A..(2007): Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. In: *J. Heart Valve Dis*, 16 (5), S. 567-573

Vesely, I. (2005): Heart valve tissue engineering. *Circ res* 97 (8), 743–755.

Wang, H., Leinwand, L. A., Anseth, K. S. (2014): Cardiac valve cells and their microenvironment--insights from in vitro studies. *Nat. Rev. Cardiol*, 11 (12), 715–727

Warnes, C. A., Liberthson, R., Danielson, G. K., Dore, A., Harris, L., Hoffman, J. I., Somerville, J., Williams, R.G., Webb, G.D. (2001): Task Force 1: the changing profile of congenital heart disease in adult life. *J. Am. Coll. Cardiol*, 37 (5), 1170–1175

White, J. F., Werkmeister, J. A., Hilbert, S. L., Ramshaw, J. A. (2010): Heart valve collagens: cross-species comparison using immunohistological methods. In: *J. Heart Valve Dis*, 19 (6), 766–771

# Materialliste

## Geräte

<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikel-/Serien-/ Fabriknummer</b>
EG 1160 Paraffinausgießstation	Leica	038630528
RM 2155 Microtom	Leica	050231619
Wasserbad	Leica	045525245
Wärmplatte Typ 13511	Medax Nagel GmbH Kiel	10737
Tissue Cool Plate COP 20	Medite Medizintechnik	904729040
Mikrowelle 700 Watt	O.k.	OMW 220-S
Wärmeschränk Typ UFB 400	Memmert	G405.1231
Kühlmaschine BL-507	Kirsch	560354
Waage BP 190S	Sartorius	50909460
Heizplatte/Motor RCT	Ikamag	0532353
Microprocessor pH-Meter HI221	Hama Instruments	573604
Axiovert 135	Zeiss	
Reference Pipette 10-100 µl	Eppendorf	
Reference Pipette 100-1000 µl	Eppendorf	

## Reagenzien

Beschreibung	Mischverhältnisse	Hersteller/ Artikelnummer
Aqua Dest		
Ethanol	100 %, 96 %, 80 %, 70 %	
Resorcinfuchsinlösung		Fa. Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Eisenhämatoxylin A/B nach Weigert		2E-032/2E-052 Waldeck GmbH u. Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland
Leitungswasser		
Pikrinsäure-Thiazinrot	7,5 ml Aqua Dest, 0,0075 g Thiazinrot, 100 ml gesättigte, wässrige Pikrinsäure	
Thiazinrot		R1A416 Fa. Waldeck GmbH u. Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland
Pikrinsäure		80456, Fluka BioChemika, Neu-Ulm, Deutschland
Xylol		J.T. Baker, Deveter, Niederlande
Eukitt quick-hardening mounting medium		Fluka Analytical, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Alcianblue 1 %		8GS(C.1.74240), Fa. Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Alkalischer Alkohol pH 8	10 ml Ammoniak + 96 % Alkohol	
Ammoniaklösung 25 % reinst		Fa. Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Resorcinfuchsin		Fa. Carl Roth GmbH + Co

		KG, Karlsruhe, Deutschland
2 % Eisenchlorid	2 g Eisenchlorid/100 ml Aqua Dest	Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Crocein-Scarlet-Säurefuchsin	Lösung A: 0,1 g Brilliant Crocein R in 99,5 ml Aqua Dest + 0,5 ml Eisessig Lösung B: 0,1 g Säurefuchsin in 99 ml Aqua Dest + 1 ml Eisessig Mischverhältnis A/B: 5:1	
Brilliant Crocein R		Chroma 1B109, Hamburg, Deutschland
Säurefuchsin		Merck 7629, Darmstadt, Deutschland
0,5 % Eisessig	0,5 ml 100 % Eisessig auf 99,5 ml Aqua Dest	Rothipurajn 100 %, Fa. Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
5 % Natriumthiosulfat	5 g Natrium- Thiosulfat/100 ml Aqua Dest	Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Saffron-Lösung	6 g Saffron du Gâtinais in 100ml Ethanol 100 %, für 48 Stunden bei 50 °C luftdicht lagern vor Gebrauch	
Saffron du Gâtinais		Chroma 5A394, Hamburg, Deutschland
5 % Phosphorwolframsäure	10 g Phosphorwolframsäure in 200 ml Aqua Dest	Fa. Waldeck GmbH u. Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland
Ziegenserum		PAA Laboratories gmbH, Pasching, Österreich
Citratpuffer pH 6,0	2,1 g Citronensäure- Monohydrat auf 1000 ml Aqua Dest	
Citronensäure-Monohydrat		Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Lösung	10ml 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Lösung	

	in 90ml 99 % Methanol	
30 % Wasserstoffperoxid		Ph.-Eur. Otto Fische GmbH, Saarbrücken, Deutschland
99 % Methanol, zur Synthese		Fa. Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Dako Pen Markierstift		Dako Deutschland GmbH, Dako Denmark ALS, Glastrup, Dänemark
1x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	100 ml 10x PBS + 900 ml Aqua Dest	
10x PBS, pH 7,4	NaCl 80 g KCL 2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 18,1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,4 g auffüllen mit Aqua Dest auf auf 1000 ml	
Natriumchlorid, reinst, rieselfähig		Fa. Appli-Chem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid		Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat		Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat		Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
1:100 Antikörper Kollagen I	10 µl Antibody to Collagen typ I + 990 µl PBS	
Antibody to Collagen type I (Teloepitide), azide free, polyclonal, Rabbit, IgG		Fa. Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
1:100 Antikörper Kollagen III	10 µl Antibody to Collagen typ III + 990 µl PBS	
Anti-Collagen III antibody (7778), polyclonal, Rabbit, IgG		Fa. Abcam, Cambridge, England

N-Histofine Simple stain max PO (Multi) Universal Immuno-peroxidase Polymer Anti-mouse- and rabbit		Nichirei Biosciences Inc., Tokio, Japan
(Chromogen)N-Histofine-DAB-3S Kit	Reagent A: DAB solution concentrate Reagent B: Enhancer solution concentrate Reagent C: Hydrogen peroxide solution concentrate Ansatz 1ml Aqua Dest + 1 Tropfen Reagent A, B, C	Fa. Medac Tornesch, Deutschland
Mayers Hämalanlösung		Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## Verbrauchsmaterial

Beschreibung	Hersteller	Artikelnummer/ Beschreibung
Erlenmeyerkolben 500ml	Schott Duran	
Deckgläser	Labsolute	Coverglasses, 7695028
Objekträger	Fa Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland	Thermo Scientific Superfrost Ultra plus
eckige Glasbecher mit Deckel		
Objekträgerhalter aus Glas für Glasbecher		
Microtom Messer	Feather	Microtome Blades 35° A35 Type
Pinsel	DaVinci	Cosmptop Mix B, 2

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Jochen Cremer, Direktor der Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, für die Möglichkeit, in seiner Abteilung promovieren zu dürfen.

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

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Anja Metzner, die mir mit ihrer überaus kompetenten Betreuung immer erreichbar zur Seite stand.

Saskia Pokorny und Dr. rer. nat. Irma Haben möchte ich für die weitere Betreuung und Unterstützung während des Kongresses in Rom danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern des herzchirurgischen Forschungslabors für die freundliche, geduldige und tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken. Besonders die Zusammenarbeit bei den Tierversuchen hat mir viel Freude bereitet. Insbesondere Dr. rer. nat. Jessica Boldt und Judith Pohanke gilt mein Dank für Ihre Unterstützung.

Ganz besonderen Dank meiner Familie und vor allem meinen Eltern, die mir das Studium und diese Dissertation überhaupt ermöglicht haben.

Zuletzt danke und widme ich diese Arbeit meiner Frau Hilka Richter. Ohne sie wäre diese Arbeit heute noch nicht fertig.