

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

TRANSAPIKALER MITRALKLAPPENERSATZ:  
HISTOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VERSCHIEDENER STENTTYPEN  
IN BEZUG AUF ENTZÜNDLICHE UND GEWEBLICHE VERÄNDERUNGEN  
IM LANGZEITVERSUCH AM HAUSSCHWEIN

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

Vorgelegt von

SINJE KRISTINA HAASLER  
aus Lübeck

Kiel 2020

---

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Felix Braun, Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 04.09.2020

gez.:

(vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Anatomie .....	1
1.2 Histologie .....	1
1.3 Abwehrmechanismen des Körpers.....	2
1.4 Erkrankungen der Mitralklappe.....	4
1.4.1 Mitralklappenstenose/ Mitralklappeninsuffizienz .....	4
1.4.2 Therapie .....	5
1.5 Ziel der Arbeit .....	6
<b>2 Methoden.....</b>	<b>7</b>
2.1 Tiere .....	7
2.2 Stents .....	7
2.3 Stentimplantation und postoperatives Vorgehen.....	9
2.4 Histologische Färbungen .....	9
2.4.1 Herstellung der histologischen Schnitte .....	9
2.4.2 Zur Herstellung histologischer Färbungen benötigte Detergenzien .....	10
2.4.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	11
2.4.5 Masson-Goldner-Färbung.....	12
2.4.6 Elastika-van-Gieson-Färbung .....	14
2.4.7 Movat-Pentachrome-Färbung .....	16
2.4.8 Van-Kossa-Färbung .....	18
2.4.9 Immunfärbung .....	19
2.5 Auswertung.....	20
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
3.1 Tier 1 .....	23

---

3.2	Tier 2 .....	28
3.3	Tier 3 .....	32
3.4	Tier 4 .....	36
3.5	Tier 5 .....	40
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	44
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>47</b>
4.1	Korrosion.....	47
4.2	Fremdkörperreaktion .....	48
4.3	Endokarditis .....	49
4.4	Kalk.....	50
4.5	Zusammenfassung der Diskussion.....	52
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Anhänge .....</b>	<b>58</b>
	<b>Abstract.....</b>	<b>58</b>
	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>60</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>61</b>

## Abkürzungen

<b>A</b>	Abb.	Abbildung
	AV-Block	Atrio-ventrikulärer Block
<b>B</b>	Bpm	beats per minute (Schläge pro Minute)
<b>C</b>	CT	Computertomographie
<b>E</b>	ETHO	Ethanol
	EvG	Elastica-van-Gieson-Färbung
<b>F</b>	FBR	foreign body reaction (Fremdkörperreaktion)
<b>H</b>	HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
<b>L</b>	LVOT	left ventricular outflow tract (Linksventrikulärer Ausflusstrakt)
<b>M</b>	MAC	Mitral annular calcification (Mitralanulusverkalkung)
	MAP	mean arterial pressure (Mittlerer arterieller Druck)
	MG	Masson-Goldner-Färbung
	mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
	MP	Movat-Pentachrome-Färbung
<b>P</b>	PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
	PKM	Perkutane Mitralkommissurotomie
	PTFE	Polytetrafluoroethylene
	PVL	Paravalvuläres Leck
<b>T</b>	TAVI	Transcatheter aortic valve implantation (Kathetergestützte Aortenklappen-Implantation)
	TEE	Transoesophageale Echokardiographie
<b>V</b>	VHF	Vorhofflimmern
	vKo	van-Kossa-Färbung
	VT	Ventrikuläre Tachykardie

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	110°-Stent .....	8
Abb. 2:	Modell 110°-Stent, drei Haken .....	8
Abb. 3:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Referenzschwein, Ventrikel, 10-fache Vergrößerung .....	11
Abb. 4:	Masson-Goldner-Färbung, Tier 4, atrio-ventrikulärer Übergang, 20-fache Vergrößerung .....	12
Abb. 5:	Elastica-van-Gieson-Färbung, Referenzschwein, Vorhof, 10-fache Vergrößerung .....	14
Abb. 6:	Movat-Pentachrome-Färbung, Tier 4, Stentbett, 20-fache Vergrößerung .....	16
Abb. 7:	van-Kossa-Färbung, Tier 1, Stentbett, 20-fache Vergrößerung.....	18
Abb. 8:	CD 68 (Darstellung von Makrophagen), Tier 1, Stentbett, 20-fache Vergrößerung .....	19
Abb. 9:	Tier 1, postmortale Untersuchung.....	24
Abb. 10:	Tier 1, Stentbett, HE, 10-fache Vergrößerung .....	25
Abb. 11:	Tier 1, Stentbett, MP, 10-fache Vergrößerung .....	25
Abb. 12:	Tier 1, Stentbett, vKo, 20-fache Vergrößerung.....	26
Abb. 13:	Tier 1, Atrium, CD45, 20-fache Vergrößerung .....	26
Abb. 14:	Tier 1, Stentbett, CD20, 20-fache Vergrößerung.....	27
Abb. 15:	Tier 2, postmortale Untersuchung.....	28
Abb. 16:	Tier 2, Stentbett, HE, 10-fache Vergrößerung .....	29
Abb. 17:	Tier 2, Stentbett, MP, 10-fache Vergrößerung .....	30
Abb. 18:	Tier 2, Stentbett, CD45, 10-fache Vergrößerung .....	30
Abb. 19:	Tier 2, Stentbett, CD45, 32-fache Vergrößerung.....	31
Abb. 20:	Tier 2, Verwachsung atrial, HE, 10-fache Vergrößerung .....	31
Abb. 21:	Tier 3, postmortale Untersuchung.....	32
Abb. 22:	Tier 3, Epikard, HE (a) und MP (b), 10-fache Vergrößerung .....	34

---

Abb. 23:	Tier 3, atriale Einwachung, MG, 10-fache Vergrößerung .....	35
Abb. 24:	Tier 3, Atrium, CD45, 20-fache Vergrößerung .....	35
Abb. 25:	Tier 4, postmortale Untersuchung.....	36
Abb. 26:	Tier 4, Stentbett, HE, 10-fache Vergrößerung .....	37
Abb. 27:	Tier 4, Stentbett, Immunfärbung CD20, 20-fache Vergrößerung.....	38
Abb. 28:	Tier 4, Atrium, MP, 20-fache Vergrößerung .....	38
Abb. 29:	Tier 4, Atrium, CD20, 20-fache Vergrößerung .....	39
Abb. 30:	Tier 4, Atrium, CD3, 10-fache Vergrößerung .....	39
Abb. 31:	Tier 5, postmortale Untersuchung.....	40
Abb. 32:	Tier 5, Stentbett, EvG, 10-fache Vergrößerung .....	42
Abb. 33:	Tier 5, Atrium, HE, 10-fache Vergrößerung .....	42
Abb. 34:	Tier 5, Atrium, CD45, 20-fache Vergrößerung .....	43
Abb. 35:	Tier 5, Atrium, MP, 20-fache Vergrößerung .....	43

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Übersicht über die Häufigkeit unterschiedlicher Mitralklappenerkrankungen in Deutschland. ....	4
<b>Tabelle 2:</b>	Alterspezifische Fallzahlen (vollstationäre Aufenthalte/100.000 Einwohner) verschiedener Mitralklappenerkrankungen in Deutschland im Jahr 2015. ....	5
<b>Tabelle 3:</b>	Übersicht über die Versuchstiere mit Angaben zu den eingebrachten Stents, der Überlebenszeit, der Todesursachen sowie Ergebnissen der postmortalen Untersuchungen. ....	7
<b>Tabelle 4:</b>	Zur Herstellung der histologischen Färbungen benötigte Detergenzien sowie die deren Hersteller, in alphabetischer Reihenfolge. ....	10
<b>Tabelle 5:</b>	Van-Kossa-Färbung: Einteilung des Ausmaßes der Verkalkung .....	22
<b>Tabelle 6:</b>	Zusammenfassung der Ergebnisse der histologischen Färbungen. ....	45
<b>Tabelle 7:</b>	Übersicht über die Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen. ...	46



# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie

Das Herz ist der zentrale Antrieb für den Blutkreislauf. Es besteht aus zwei Kammern (Ventrikel) und zwei Vorhöfen (Atrium). Die Herzklappen sorgen für einen gerichteten Strom des Blutes.

Zwischen den Vorhöfen und Kammern liegen die Segelklappen, die Trikuspidalklappe auf der rechten Seite, die Mitralklappe auf der linken Seite. Die Segelklappen (Aorten- und Pulmonalklappe) liegen in den jeweiligen Ausflussbahnen des Ventrikels. Das Öffnen und Schließen der Herzklappen wird durch den Druckgradienten zwischen den Kammern gesteuert. Bei den Segelklappen wird ein Rückschlagen der Segel in den Vorhof durch einen Halteapparat, die Chordae tendinae, verhindert. Diese bestehen aus Papillarmuskeln und Sehnenfäden [1].

Sauerstoffarmes Blut aus der Vena cava gelangt in den rechten Vorhof und durch die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel, von dort wird es durch die Pulmonalklappe in den Lungenkreislauf gepumpt. Das jetzt oxigenierte Blut fließt in den linken Vorhof, von dort durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel. Durch Kontraktion des Ventrikels wird das Blut durch die Aortenklappe in den Körperkreislauf gepumpt.

## 1.2 Histologie

Das Gewebe im Herz ist dreischichtig aufgebaut. Die innere, dem Lumen zugewandte Schicht ist das Endokard, welches sich aus Endothel und einer subendothelialen Schicht zusammensetzt. Diese enthält neben kollagenen und elastischen Fasern auch glatte Muskelzellen. Das Endokard setzt sich in die Intima der an das Herz angrenzenden Blutgefäße fort.

Darunter liegt eine an den verschiedenen Stellen des Herzens unterschiedlich stark ausgeprägte Schicht aus subendokardialem Bindegewebe mit darin verlaufenden Nerven, Blutgefäße und Fasern des Erregungsleitungssystems.

Das Myokard besteht zum größten Teil aus Kardiomyozyten, den Herzmuskelzellen. Diese werden vom Endomysium, dem interstitiellem Bindegewebe, umgeben, welches mit dem Endo-

und Epikard verbunden ist. Das Epikard ist ein einschichtiges Plattenepithel, welches das Herz als Serosa überzieht sowie einer dünnen Bindegewebeschicht.

Vorhöfe und Kammern sind durch eine Platte aus straffem Bindegewebe, dem Herzskelett, voneinander getrennt. Es bildet um die Öffnungen des Herzens einen Faserring, den Anulus fibrosus, an dem die Klappen befestigt sind.

Alle Klappen sind Teil des Endokards und prinzipiell mikroskopisch gleich aufgebaut. An den Außenseiten sind sie von Endothel überzogen. Das innenliegende Bindegewebe ist in zwei Schichten unterteilt. Auf der Seite, die bei geschlossener Klappe Zugkräften ausgesetzt ist, findet man die Fibrosa. Diese Schicht zeichnet sich durch viel straffes Bindegewebe aus und ist mit dem Anulus fibrosus sowie den Chordae tendinae verbunden. Bei der Mitralklappe ist diese Schicht dem Ventrikellumen zugewandt. Daneben ist die Spongiosa zu sehen, charakterisiert durch das Auftreten von elastischen Fasern, Fibroblasten, Makrophagen und einen hohen Gehalt an Hyaluronan und Proteoglycanen [1].

### **1.3 Abwehrmechanismen des Körpers**

Um sich vor Infektionen, das heißt dem Eindringen und der Ausbreitung pathogener Mikroorganismen zu schützen, besitzt der Körper unterschiedliche Abwehrmechanismen. Zunächst bilden Haut und Schleimhäute eine erste Barriere. Gelangen dennoch Erreger in den Körper, so besitzt der Körper eine unspezifische, angeborene, sowie eine spezifische, erworbene Immunantwort. Diese bestehen jeweils aus humoralen und zellulären Komponenten.

Die unspezifische humorale Abwehr besteht aus Komponenten wie dem Komplementsystem, Lysozym und Interferonen.

Zum zellulären angeborenen Immunsystem gehören vor allem die Granulozyten und Makrophagen. Letztere differenzieren sich aus Monozyten, nachdem sie die Gefäßbahnen verlassen haben. Makrophagen nehmen in der Immunantwort zahlreiche Aufgaben wahr. Sie phagozytieren Zelltrümmer, Fremdkörper oder Bakterien. Als Antigen-präsentierende Zelle ist sie ein wichtiges Verbindungsglied zur spezifischen Immunantwort. Durch die Sekretion von Zytokinen werden andere Abwehrzellen aktiviert.

Die spezifische Immunantwort besteht vor allem aus B- und T-Lymphozyten. Naive T-Lymphozyten werden durch antigenpräsentierende Zellen, also beispielsweise Makrophagen, aktiviert, indem diese mit dem T-Zell-Rezeptor an das Antigenpeptid bindet. Je nach Spezifität der T-Zelle differenziert sich diese entweder zu einer Zytotoxischen-T-Zelle, die vor allem bei der Bekämpfung von Viren von Bedeutung ist, oder zu einer T-Helferzelle. Gleichzeitig findet eine durch selbst ausgeschüttete Zytokine induzierte klonale Proliferation der aktivierten T-Zellen statt. B-Zellen sind selbst Antigen-präsentierende Zellen. Bindet eine aktivierte T-Helferzelle mit seinem T-Zell-Rezeptor an einen B-Zell-Rezeptor, welcher ein Antigenpeptid präsentiert, so kommt es zu einer Aktivierung der B-Zelle und damit zum einen zur Vermehrung der B-Zelle sowie zur massenhaften Ausschüttung von spezifischen Antikörpern, welche die spezifische humorale Immunantwort bilden. Die Antikörper binden an die Erreger und erleichtern damit unter anderem die Phagozytose.

Lymphozyten zirkulieren ständig zwischen den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, der Blutbahn, dem Interstitium und den Lymphwegen. Der größte Anteil der gegenseitigen Aktivierung findet in den sekundären lymphatischen Organen statt.

Eine Entzündungsreaktion kann jedoch nicht nur durch Mikroorganismen hervorgerufen werden. Auch chemische (z.B. Säuren) oder physikalische Noxen (Strahlung), nekrotischer Zelltod (z.B. im Rahmen einer Ischämie), Gewebetraumata und das iatrogene Einbringen von Fremdkörpern lösen eine akute Entzündungsreaktion aus.

Nicht jede Entzündungsreaktion ist als Krankheitsprozess zu verstehen, sondern viel mehr als eine mehr oder weniger unspezifische Reaktion des Körpers auf schädigende Einflüsse. Ziel einer solchen Reaktion ist es, die Schädigung zu beseitigen und eine Reparatur des entstandenen Schadens. So liegt jeder Heilung eine Entzündungsreaktion zu Grunde: Nachdem es zu einer Gewebeverletzung gekommen ist, kommt es zur Einwanderung von Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen in das betroffene Gebiet. Zelltrümmer, abgestorbene Zellen und Bakterien können somit bekämpft bzw. phagozytiert werden. Makrophagen sezernieren verschiedene Zytokine, dadurch kommt es zur Angiogenese, also der Neubildung von Blutgefäßen, sowie zur verstärkten Kollagenbildung durch Fibroblasten und deren Proliferation [2] .

## 1.4 Erkrankungen der Mitralklappe

### 1.4.1 Mitralklappenstenose/ Mitralklappeninsuffizienz

Nach der Aortenklappe ist die Mitralklappe die in Deutschland am zweithäufigsten von Erkrankungen betroffene Herzklappe. Die Klappe kann entweder verengt sein (Mitralklappenstenose), sodass in der Diastole keine ausreichende Menge an Blut in den Ventrikel gelangt oder sie schließt nicht vollständig (Mitralklappeninsuffizienz), sodass es während der Systole zu einem Rückfluss aus dem Ventrikel in den Vorhof kommt. Die Ursachen dafür sind unterschiedlich. Grundsätzlich kann man zwischen angeborenen und erworbenen Mitralklappenvitien unterscheiden wobei die angeborenen Mitralklappenvitien in Deutschland recht selten sind. Durch rheumatisches Fieber verursachte Mitralklappenerkrankungen sind im Laufe der letzten Jahre deutlich rückläufig. Derzeit ist allerdings ein deutlicher Anstieg der Fallzahlen bei Patienten mit nicht-rheumatischen Mitralklappenerkrankungen zu verzeichnen, hier vor allem bei der Mitralklappeninsuffizienz (Tabelle 1). Betrachtet man die altersspezifischen Fallzahlen der Mitralklappeninsuffizienz, so fällt der sprunghafte Anstieg bei Patienten über 65 Jahren auf, sodass man hier von einer Erkrankung der älteren Menschen sprechen kann (Tabelle 2) [3].

**Tabelle 1:** Übersicht über die Häufigkeit unterschiedlicher Mitralklappenerkrankungen in Deutschland. Diagnosedaten der Krankenhäuser (alle Fälle), absolute Zahlen für die Jahre 2000, 2010, 2016. Auffallend ist der Rückgang der Behandlungszahlen rheumatischer Mitralklappenerkrankungen bei gleichzeitiger Zunahme der nicht-rheumatischen Erkrankungen, Tabellen gemäß Zahlen der Gesundheitsberichterstattung des Bundes [3]

	2016		2010		2000	
	insgesamt	>65 Jahre	insgesamt	>65 Jahre	insgesamt	>65 Jahre
rheumatische Mitralklappenerkrankungen	828	487	893	530	4906	2693
Stenose	232	136	331	195	1345	737
Insuffizienz	331	84	370	44	979	378
nicht-rheumatische Mitralklappenerkrankungen	21632	15344	13828	9024	10101	5505
Insuffizienz	19006	13787	11420	7646	7579	4466
Prolaps	1153	540	1155	521	668	185
Stenose	516	349	511	354	1000	427
angeborene Mitralklappenstenose	55	x	51	x	39	3
angeborene Mitralklappeninsuffizienz	70	5	88	6	72	5

**Tabelle 2:** Altersspezifische Fallzahlen (vollstationäre Aufenthalte/100.000 Einwohner) verschiedener Mitralklappenerkrankungen in Deutschland im Jahr 2015. Auffallend ist vor allem bei der Mitralsuffizienz der sprunghafte Anstieg der Fallzahlen ab dem 65. Lebensjahr. Tabellen gemäß Zahlen der Gesundheitsberichterstattung des Bundes [3]

Altersklasse	altersspezifische Fallzahlen Deutschland (X/100.000 Einwohner)			
	Mitralsuffizienz	Mitralprolaps	Mitralstenose	rheumatische Mitralklappenerkrankungen
15-45 Jahre	2	0	0	0
45-65 Jahre	18	2	1	1
ab 65 Jahren	73	3	2	3

Bei einer tendenziell älter werdenden Gesellschaft ist in der Zukunft mit einer deutlichen Zunahme an Patienten mit Mitralklappenerkrankungen zu rechnen. Bis 2050 ist nach Berechnungen der Vereinten Nationen im westlichen Europa mit einer Steigerung der Lebenserwartung um fünf Jahre zu rechnen, sodass hier die durchschnittliche Lebenserwartung voraussichtlich von aktuell 80,5 Jahre auf 85,5 Jahre ansteigen wird [4].

### 1.4.2 Therapie

Gemäß aktueller Leitlinie stehen neben der konservativen, medikamentösen Therapie bei Mitralklappeninsuffizienz das perkutane Mitralklappen-Clipping zur Verfügung, bei Mitralstenose die perkutane Mitralkommissurotomie (PKM) zur Verfügung. Ein offenes Mitralklappen-repair wird häufig nur in Kombination mit anderen kardiochirurgischen Eingriffen, wie zum Beispiel einer Bypass-OP, empfohlen. Muss die Mitralklappe ersetzt werden, so gilt der operative Mitralklappenersatz unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine zurzeit als „Goldstandard“ [5]. Bei diesem Eingriff wird der Thorax mittels kompletter medialer Sternotomie eröffnet, sodass das Herz nach Eröffnung des Perikards dargestellt wird. Nachdem der extrakorporale Kreislauf durch die Herz-Lungen-Maschine sichergestellt ist, kann die Mitralklappe im linken Vorhof dargestellt werden. Diese wird entfernt, sodass ein biologischer Klappenersatz in den Mitralanulus eingenäht werden kann. Ein erfahrenes Operations-Team braucht für einen solchen Eingriff in der Regel ca. drei Stunden. Solch ein Eingriff ist für den Betroffenen, nicht zuletzt durch die Etablierung eines extrakorporalen Kreislaufes sehr belastend [6]. Die Morbidität und Mortalität der Patienten, die sich einer solchen Operation unterziehen müssen, ist zu einem hohen Maße vom Alter des Patienten abhängig. Mit steigendem Alter nehmen perioperative

Komplikationen kontinuierlich zu, die intraoperative Sterblichkeit steigt vor allem ab dem 70. Lebensjahr [7]. Bei dem bereits etablierten Verfahren zum minimalinvasiven Aortenklappenersatz (Transcatheter aortic valve implantation, TAVI) konnte gezeigt werden, dass Patienten, welche vom Operationsteam als nicht operationsfähig eingestuft wurden, von der TAVI-Therapie im Vergleich zur konservativen Standard-Therapie profitierten [8].

## **1.5 Ziel der Arbeit**

Aus diesem Grund wird seit einigen Jahren an der Entwicklung minimalinvasiver stentgestützter Mitralklappenersatz-Verfahren geforscht. Erste klinische Studien am Menschen haben die grundsätzliche Machbarkeit der transapikalen Implantation einer Mitralklappe bewiesen, verdeutlichten aber auch die Herausforderungen, vor denen die Entwicklung eines Stents steht, wie zum Beispiel das Auftreten thromboembolischer Ereignisse oder die Verlegung des linksventrikulären Ausflusstraktes (LVOT) [9].

In Kurzzeitversuchen im Schweinmodell konnten sich die ersten Stents beweisen [10]. Unter ständiger Weiterentwicklung ergaben sich weitere Stent-Typen, die sich vor allem durch den Winkel, in dem sich der atriale Anteil des Stents an den ventrikulären Teil anschließt unterscheiden. Hier zeigten sich deutlich gestiegene Überlebenszeiten [11], [12].

In dieser Arbeit erfolgte die histologische Evaluation zweier Stent-Typen im Hinblick auf langfristige gewebliche Veränderungen und Entzündungsreaktionen in dem an den Stent angrenzenden Herzgewebe.

## 2 Methoden

### 2.1 Tiere

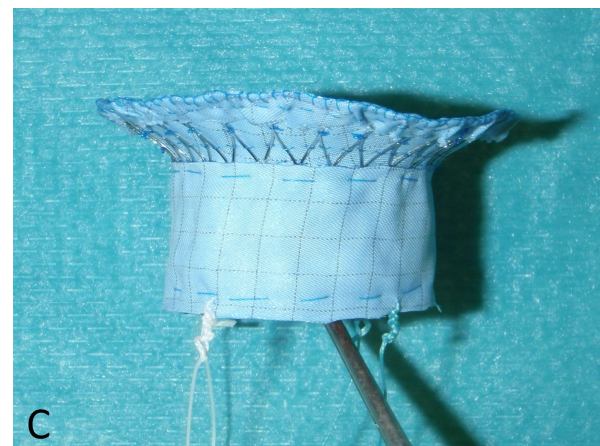
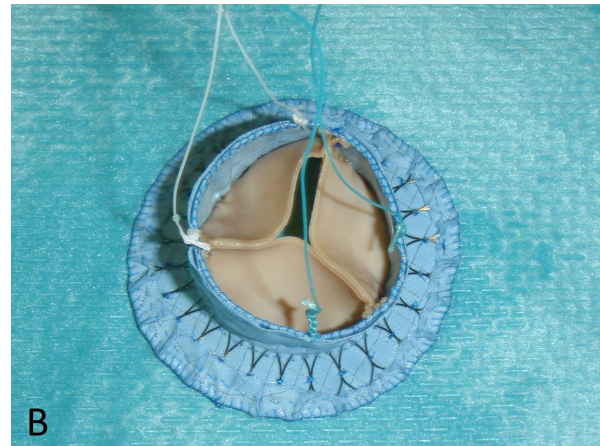
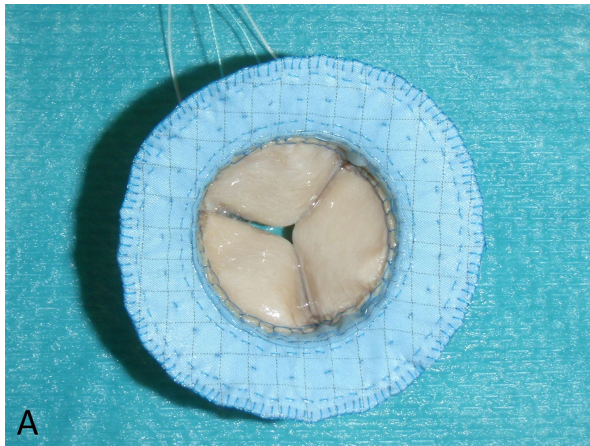
Für diese Arbeit wurden n=34 Tiere operiert und beobachtet. Von diesen Tieren überlebten dann fünf Tiere vier Wochen oder länger. Diese fünf Tiere wurden für diese Arbeit analysiert. Dafür wurden makroskopische, histologische und immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Bei den Tieren handelte es sich um Schweine der Rasse Deutsche Landrasse oder Deutsches Edelschwein, jeweils zwischen 50 und 60 kg schwer und präoperativ klinisch gesund. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Versuchstiere.

**Tabelle 3:** Übersicht über die Versuchstiere mit Angaben zu den eingebrachten Stents, der Überlebenszeit, der Todesursachen sowie Ergebnissen der postmortalen Untersuchungen.

	KG	Stent	post-op Überlebenszeit	Todesursache, postmortale Diagnosen
Tier 1	51 kg	110°	4 Wochen	Herz-Kreislaufversagen in Narkose; Mitralklappenstenose, Endokarditis, Myokardinfarkt
Tier 2	52 kg	110°	4 Wochen	Euthanasie: V.a. Endokarditis, Mitralstenose
Tier 3	50 kg	110°	5 Wochen	Beatmungszwischenfall in Narkose (stentunabhängig)
Tier 4	50 kg	110°	8 Wochen	Euthanasie: Pneumonie, Stentbruch, Mitralinsuffizienz, milde Zeichen einer Endokarditis
Tier 5	46 kg	110° mit drei Haken	12 Wochen	Euthanasie: PVL, Stentbruch, V.a. Endo- und Perikarditis

### 2.2 Stents

Die Anforderungen an den entwickelten Stent beinhalteten vor allem einen sicheren Halt im linken Herzen mit möglichst geringem paravalvulärem Leck bei nur minimaler Stentverformung am schlagenden Herzen. Bei den verwendeten Stents handelt es sich um selbst-expandierenden Nitinol-Stents. Es überlebten nur Tiere mit einem 110°-Stent länger als vier Wochen, weswegen im Folgenden auch nur noch diese Sorte von Stents betrachtet wird. Diese bestehen aus einem runden, ventrikulären Teil, an dem sich in einem Winkel von 110° der atriale Anteil anschließt (Abbildung (Abb.) 1).

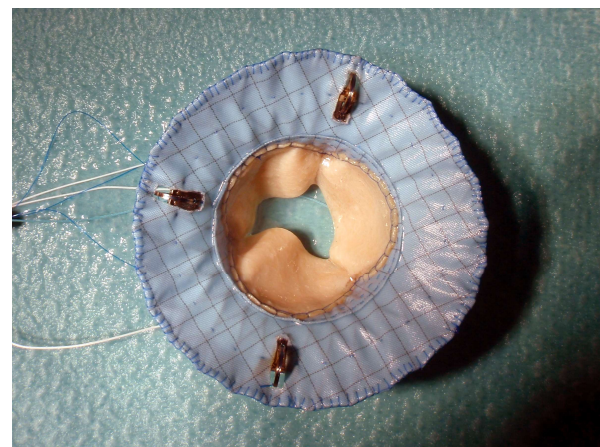


**Abb. 1: 110°-Stent**

A: atriale Ansicht; B: ventrikuläre Ansicht; C: Ansicht von der Seite

Maße im Original: Durchmesser annulär: 30 mm; äußerer Durchmesser: 58 mm; Höhe: 14 mm, runder Stentkörper, Winkel zwischen annulärem und ventrikulärem Anteil: 110°

Bei einem Tier wurde ein 110°-Stent verwendet, bei dem zusätzlich drei Haken im Winkel zwischen dem annulären und dem ventrikulären Teil angebracht wurde (Abb. 2). Der gesamte Stent ist mit einer Polytetrafluoroethylene (PTFE)-Membran bezogen. Als Klappen wurden porkine Aortenklappen aus Perikardgewebe eingenäht. Als ventrikulärer Halteapparat wurden drei Neochordae am unteren Ende des Stents angebracht.



**Abb. 2: Modell 110°-Stent, drei Haken**

Technische Daten und Aufbau wie in Abb. 1, hier aber zusätzlich 3 Haken im atrialen Anteil.

Die Arbeitsgruppe hatte im Laufe der Zeit unterschiedliche Stent-Typen entwickelt. Der in diesem Versuch verwendete hatte sich dabei als bisher potentiell am langlebigsten und effektivsten herausgestellt [11], [12], [13].



## **2.3 Stentimplantation und postoperatives Vorgehen**

Das Einbringen der Stents erfolgte durch die Arbeitsgruppe unter Beteiligung eines Herzchirurgen/einer Herzchirurgin und eines Tierarztes/einer Tierärztin. Das Einbringen des Stents und die perioperative Betreuung war nicht Bestandteil dieser Arbeit, jedoch wird das Vorgehen zum besseren Verständnis hier mit aufgeführt.

Zum Einbringen des Stents wurden die Tiere mittels TIVA (Totale intra-venöse Anästhesie) in Narkose versetzt und für die Dauer des Eingriffes ein kontinuierliches invasives Kreislaufmonitoring angeschlossen. Mittels unterer Ministernotomie wurde die Herzspitze dargestellt. Nach der Vollheparinisierung des Tieres wurde der Zugang durch den Apex geschaffen, durch den der gefaltete Stent mit Hilfe eines Applikators in die gewünschte Position über der Mitralklappe gebracht wurde. Dies geschah unter ständiger sonographischer Kontrolle mittels transösophagealer Echokardiographie (TEE). Nachdem der Stent richtig positioniert war, wurde der Applikator zurückgezogen, die Neochordae am Apex fixiert und der Thorax verschlossen.

Die hämodynamische Überwachung, auch mittels TEE, wurde nach Stentimplantation noch eine Stunde kontinuierlich weitergeführt.

Postoperativ wurden die Tiere weiter klinisch überwacht. Nach einem Monat wurde u.a. erneut ein TEE und ein kardio-CT durchgeführt. Waren die Tiere in einem guten Allgemeinzustand, wurde die Beobachtungsperiode um einen Monat verlängert. Beim Auftreten von Komplikationen, z.B. schweren mitralen Regurgitationen oder schlechtem klinischem Zustand der Tiere sowie zum Ende der Beobachtungszeit wurden diese euthanasiert [12].

## **2.4 Histologische Färbungen**

### **2.4.1 Herstellung der histologischen Schnitte**

Nach der makroskopischen Untersuchung des Herzens wurden die gewünschten Gewebeproben entnommen und für drei Tage in Formalin fixiert.

Für diese Arbeit wurden die Proben am Stentbett sowie am atrialen Übergang des linken Herzens entnommen. Danach wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und schließlich in Paraffinblöcken eingebettet. Anschließend wurden die Blöcke gekühlt und mit

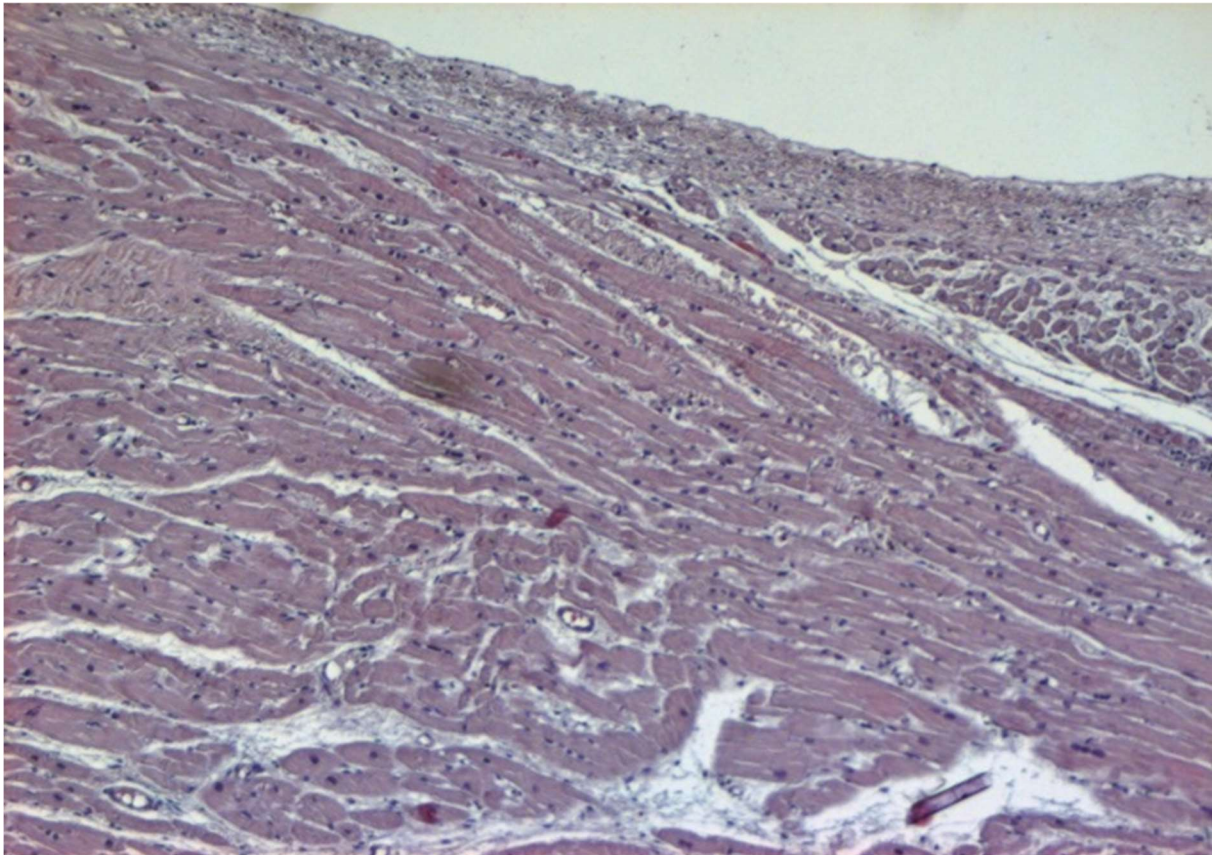
Hilfe des Mikrotoms 3µm feine Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger gebracht und auf einer Wärmeplatte getrocknet.

## 2.4.2 Zur Herstellung histologischer Färbungen benötigte Detergenzien

**Tabelle 4:** Zur Herstellung der histologischen Färbungen benötigte Detergenzien sowie die deren Hersteller, in alphabetischer Reihenfolge

Alcainblau 8GS	Carl-Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniaklösung 25%	Carl-Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Anti-CD3	Bio Genex Laboratories GmbH, Mainz, Deutschland
Brilliant Crocein R	Waldeck GmbH und CoKG, Münster, Deutschland
Chromogen N-Histofine DAB - 3S kit	Nichirei Biosciences Inc., Tokio, Japan
Eisen-Hämatoxylin A nach Weigert	Waldeck GmbH und CoKG, Münster, Deutschland
Eisen-Hämatoxylin B nach Weigert	Waldeck GmbH und CoKG, Münster, Deutschland
Eisen-III-chlorid-Hexahydrat	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Carl-Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin G-Lösung 1%	Carl-Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99%, vergällt	BÜFA Chemikalien CoKG, Hude, Deutschland
Eukitt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kerneisenrot Aluminiumsulfat	Carl-Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Lichtgrün	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaulösung	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Monoclonal Antibody B Cells	BioLogo Dr. Hartmut Schultheiss e.K., Kronshagen, Deutschland
Mouse Anti PIG CD 203a	MyBioSource, Inc, San Diego, USA
Mouse Anti Sheep CD45	Bio Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim, Germany
Natriumthiosulfat (wasserfrei)	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
N-Hisofine Simple Stain MAX PO Universal Immuno-peroxidase Polymer	Nichirei Biosciences Inc., Tokio, Japan
Orange G	Waldeck GmbH und CoKG, Münster, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphorwolframsäure	Waldeck GmbH und CoKG, Münster, Deutschland
Pikrinsäure -Lösung	Biochemik Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Pyrogallol	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Resorcin-Fuchsin	Carl-Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Saffron de Gatinais	Waldeck GmbH und CoKG, Münster, Deutschland
Säurefuchsin	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Thiazinrot R	Waldeck GmbH und CoKG, Münster, Deutschland
Wachsstift "Dako Pen"	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Wasserstoffperoxid Lösung 30%	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Xylol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ziegen Serum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Zitronensäure-Monohydrat	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland

#### 2.4.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung



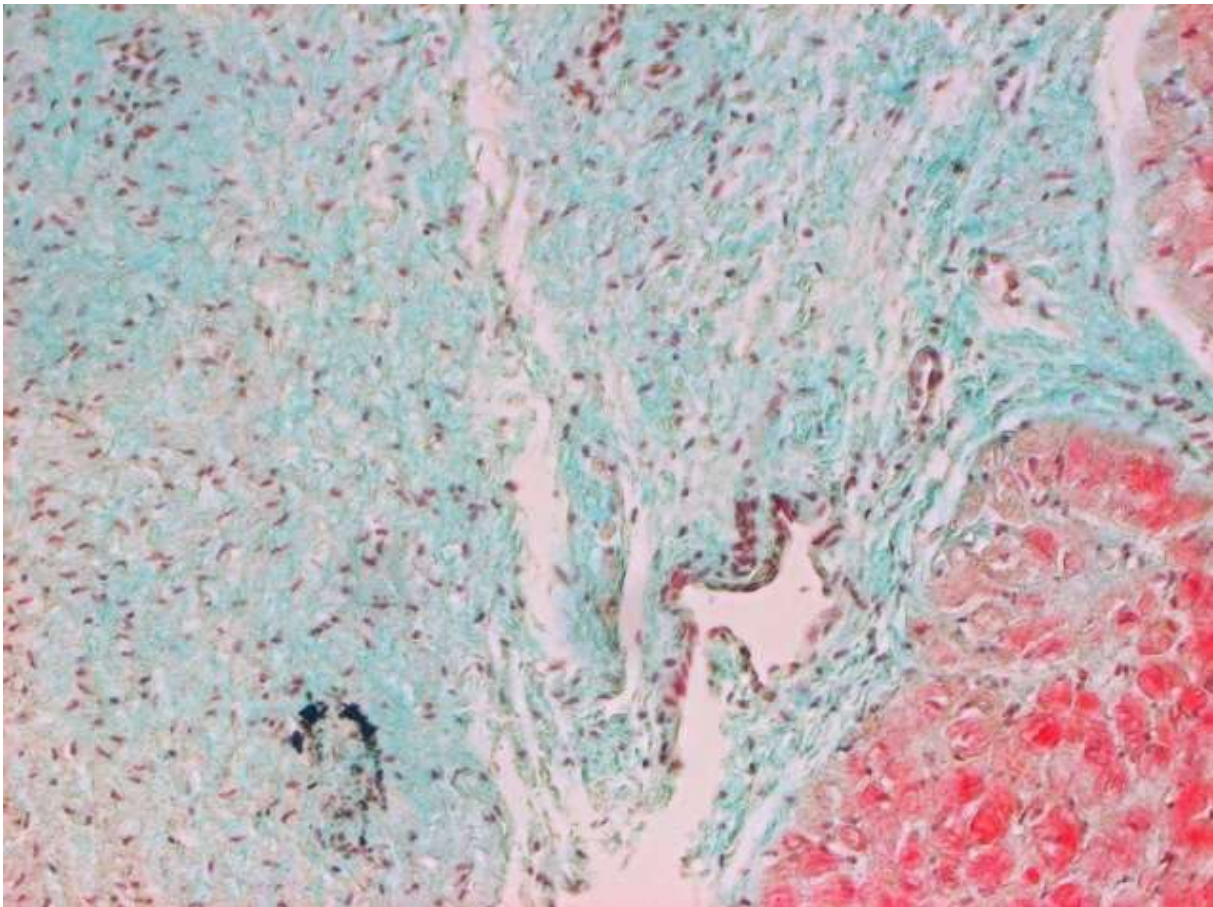
**Abb. 3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Referenzschwein, Ventrikel, 10-fache Vergrößerung**  
Zellkerne erscheinen blau, Zytoplasma rosa-rot.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) ist eine Übersichtsfärbung.

Die geschnittenen Präparate wurden zunächst in Xylol (je zwei mal zehn Minuten) aus ihrem Paraffin-Bett gelöst und danach in einer absteigenden Alkoholreihe (99% Ethanol (ETHO), 96% ETHO, 90% ETHO, 80% ETHO, 70% ETHO, destilliertes Wasser) gewässert (jeweils fünf Minuten). Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch Eintauchen der Objektträger in Hämlaunlösung für zwei Minuten, gefolgt durch 20-minütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Zur Darstellung des Zytoplasmas wurde das Präparat anschließend zwei Minuten lang mit Eosin gefärbt. Im nächsten Schritt wurden die Präparate unter Leitungswasser gespült sowie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% ETHO, 80% ETHO, 90% ETHO, 96% ETHO, 99% ETHO) für jeweils fünf Minuten und zweimal für je acht Minuten in Xylol dehydriert. Zum Schluss wurden die Präparate mit Eukitt und Deckgläsern fixiert.

Das Ergebnis ist eine Übersichtsfärbung, in der Zellkerne dunkelblau bis schwarz erscheinen, während Zytoplasma rosa-rot angefärbt ist (Abb. 3).

### 2.4.5 Masson-Goldner-Färbung



**Abb. 4: Masson-Goldner-Färbung, Tier 4, atrio-ventrikulärer Übergang, 20-fache Vergrößerung**  
Bindegewebe ist grün, Zytoplasma und Muskelzellen rot, Zellkerne dunkelbraun.

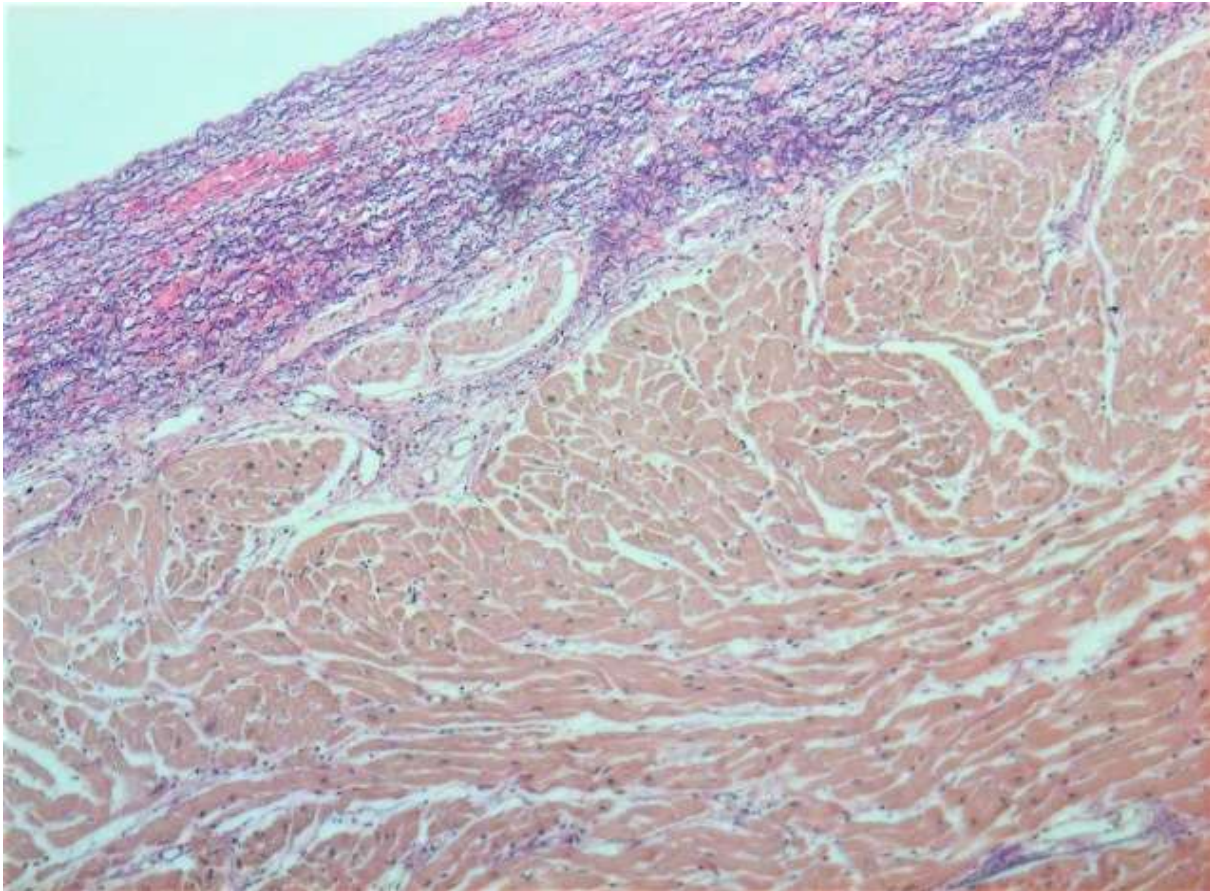
Auch die Masson-Goldner-Färbung (MG) dient der Übersicht, jedoch erlaubt sie eine genauere Unterscheidung der unterschiedlichen Gewebebestandteile.

Zum Anfertigen dieser Färbung mussten die Schnitte zunächst zweimal für acht Minuten in Xylol entparaffiniert werden, bevor sie in einer absteigenden Alkoholreihe und zuletzt in destilliertem Wasser rehydriert wurden. Auf das zwei- bis dreiminütige Färben in Eisenhämatoxylin folgte das Bläuen für zehn Minuten unter fließendem Wasser. Im Anschluss wurden die Präparate zum Differenzieren für wenige Sekunden in 0,5%ige Phosphorwolframsäure-Lösung getaucht, der Vorgang wurde durch das Spülen für fünf Minuten in drei Portionen destilliertem Wasser unterbrochen. Zum Anfärben von Zytoplasma und Muskelfasern wurden die Schnitte für fünf Minuten in Azophloxin gebadet und anschließend differenziert. Dafür wurden

sie zunächst kurz in 1%iger Essigsäure gespült, dann ca. 20 Minuten in Phosphorwolframsäure-Orange G getaucht und schließlich erneut kurz mit 1%iger Essigsäure gespült. Zur Darstellung des Bindegewebes erfolgte noch die Färbung in Lichtgrün für eine bis drei Minuten, welche durch erneutes kurzes Waschen in 1%iger Essigsäure unterbrochen wurde. Zuletzt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und zweimal für acht Minuten in Xylol getaucht, bevor das Deckeln mit Eukitt erfolgt.

Diese Färbung lässt Bindegewebe in einem leuchtenden Grün erscheinen, Zellkerne sind dunkelbraun bis schwarz angefärbt, Zytoplasma und Muskelzellen rot (Abb. 4).

### 2.4.6 Elastika-van-Gieson-Färbung



**Abb. 5:** Elastika-van-Gieson-Färbung, Referenzschwein, Vorhof, 10-fache Vergrößerung

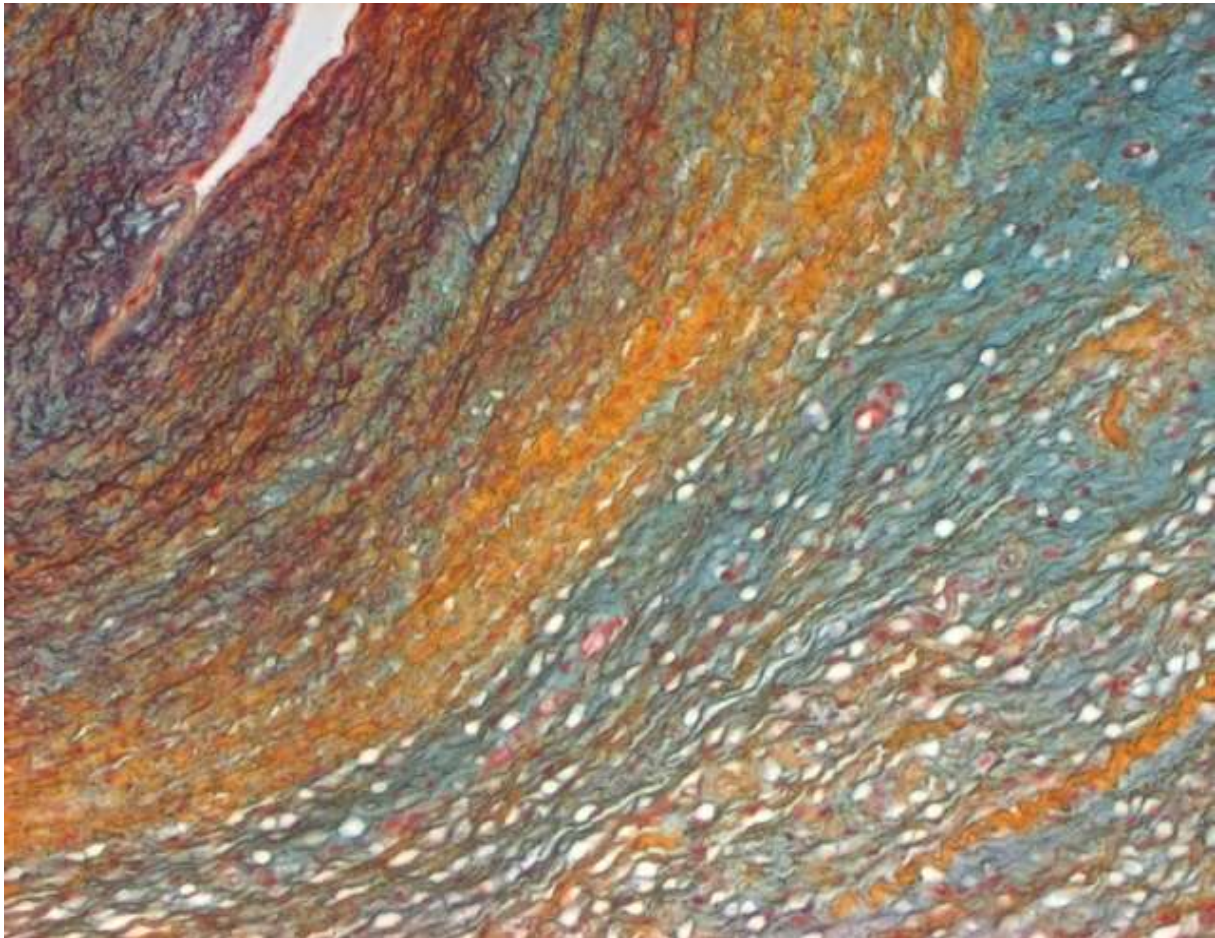
Zellkerne sind dunkelbraun bis schwarz, elastische Fasern erscheinen dunkel-violett bis schwarz, Muskelzellen gelb und Kollagenfasern rot

Die Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG) ermöglicht die Unterscheidung des Bindegewebes und dient vor allem der Darstellung von elastischem Bindegewebe. Um diese Färbung anzuwenden wurden, die Schnitte zunächst zweimal acht Minuten in Xylol entparaffiniert, danach erfolgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe bis zu einer Konzentration von 80%. Dann wurde das Präparat 20 bis 30 Minuten zur Darstellung der elastischen Fasern mit Resorcinfuchsin gefärbt, anschließend zunächst unter fließendem Leitungswasser und dann in destilliertem Wasser gespült. Es folgte eine Differenzierung in einer 80%igem Alkohollösung. Diese wurde durch einminütiges Eintauchen in destilliertes Wasser unterbrochen. Nach Erfolgskontrolle der Färbung unter dem Mikroskop wurde das Präparat zwei bis drei Minuten mit Eisenhämatoxylin nach Weigert gefärbt. Im Anschluss wurde das Präparat zunächst mit destilliertem Wasser und dann für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, bevor es zur Darstellung der Muskelzellen, des Zytoplasmas sowie des kollagenen Gewebes

für zwei bis fünf Minuten mit Pikrinsäure-Thiazinrot gefärbt wurde, um dann erneut in destilliertem Wasser gespült zu werden. Dann wurde der Objektträger zweimal für eine Minute in eine 96%ige Alkohollösung und zuletzt zweimal acht Minuten in Xylol getaucht. Die Versiegelung durch Eukitt schloss die Färbung ab.

Nach der Färbung stellen sich Zellkerne dunkelbraun bis schwarz dar, elastische Fasern erscheinen dunkel-violett bis schwarz, Muskelzellen gelb und Kollagenfasern rot (Abb. 5).

### 2.4.7 Movat-Pentachrome-Färbung



**Abb. 6: Movat-Pentachrome-Färbung, Tier 4, Stentbett, 20-fache Vergrößerung**

Zellkerne und elastische Fasern erscheinen schwarz, Kollagen gelb, Grundsubstanz blau, Muskelzellen rot, Fibrin leuchtend rot.

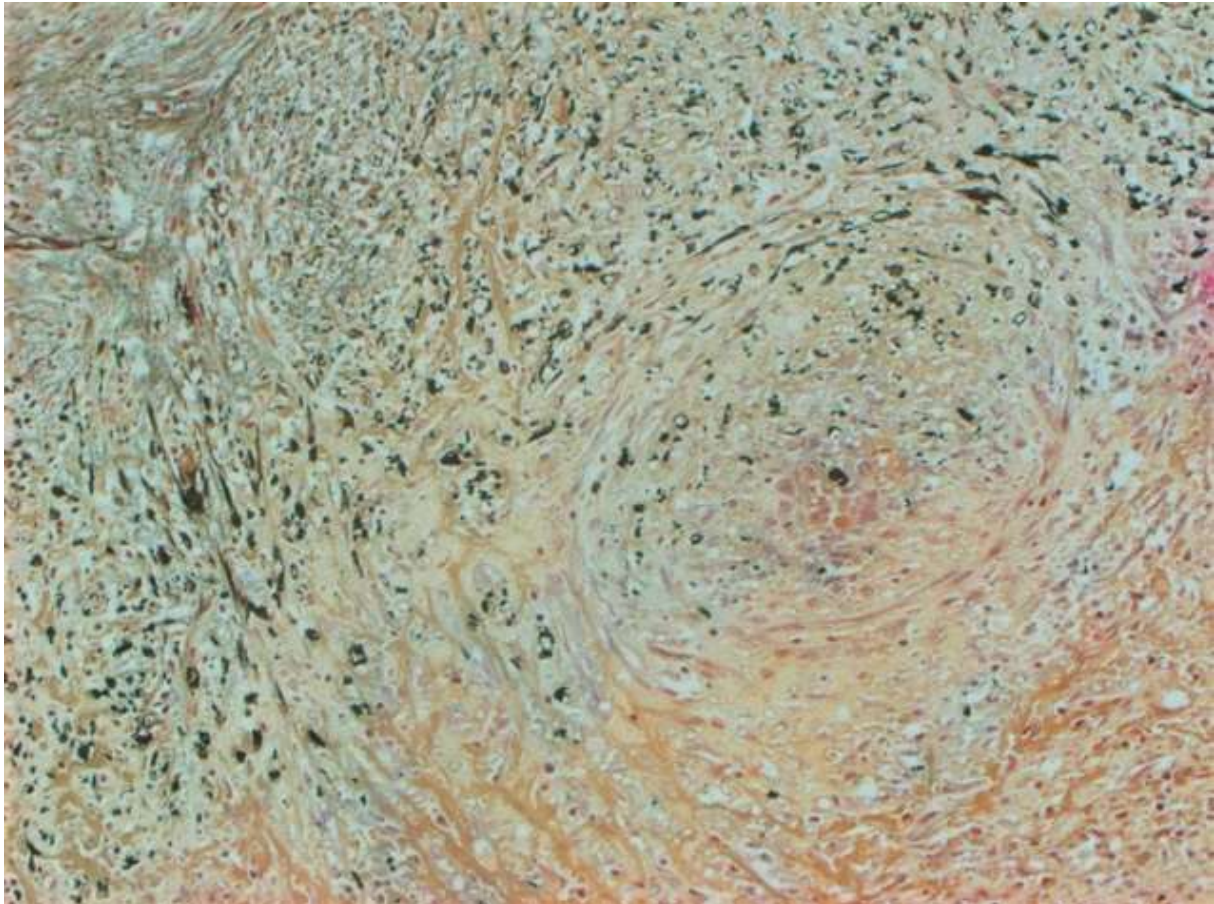
Die Movat-Pentachrome-Färbung (MP) dient der weiteren Differenzierung des Gewebes, vor allem Fibrin lässt sich durch diese Färbung sehr gut darstellen. Dafür wurden die Objektträger mit den Schnitten durch ein zweimaliges Bad in Xylol zunächst entparaffiniert, bevor sie in einer absteigenden Alkoholreihe und zuletzt in destilliertem Wasser rehydriert wurden. Nach der zwanzigminütigen Färbung in gefiltertem, 1%igem Alcainblau, wurden die Präparate für fünf Minuten in fließendem Leitungswasser gespült, bevor sie für eine Stunde in alkalischem Alkohol (1/10 Ammoniak, 9/10 Alkohol) inkubierten. Die Inkubation wurde durch zehnmütiges Spülen mit Wasser unterbrochen. Es folgte die Färbung durch Resorcinfuchsin für 15 Minuten, gefolgt durch mehrfaches, kurzes Spülen mit destilliertem Wasser. Jetzt erfolgte die Differenzierung in 2%igem Eisenchlorid für fünf Minuten, gefolgt durch die einminütige Fixie-



rung in 5%igem Natrium-Thiosulfat, welche durch eine fünf Minuten lange Spülung in Leitungswasser unterbrochen wurde. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für fünf Minuten in Crocein-Scarlet-Säurefuchsin, danach wurden die Proben mehrfach kurz mit Leitungswasser gespült. Es folgte die Differenzierung durch fünfmaliges Eintauchen für jeweils wenige Sekunden in 0,5%ige Essigsäure, bevor die Schnitte vier Minuten lang in 5%iger Phosphorwolframsäure badeten. Die Differenzierung wurde durch erneutes fünfmaliges, kurzes Eintauchen in 0,5%ige Essigsäure beendet. Es folgte eine dreimalige Spülung in für jeweils vier Minuten in reinem Alkohol, bevor die Präparate zur Darstellung von Muskeln, Kollagen und Fibrin für 20 Minuten in Safranlösung gefärbt wurden. Die Färbung wurde durch erneutes, dreimaliges Baden in 100%igem Alkohol abgeschlossen. Vor dem Eindeckeln erfolgte noch das zweifache Spülen für je acht Minuten in Xylol.

Das Gewebe ist schließlich wie folgt angefärbt: Zellkerne und elastische Fasern erscheinen schwarz, Kollagen ist gelb, Mucin blau, Muskelzellen rot angefärbt. Fibrin erscheint in einem satten, leuchtenden rot (Abb. 6).

### 2.4.8 Van-Kossa-Färbung



**Abb. 7:** van-Kossa-Färbung, Tier 1, Stentbett, 20-fache Vergrößerung  
Verkalkungen erscheinen schwarz, Zytoplasma hell-, Zellkerne dunkelbraun.

Die van-Kossa-Färbung (vKo) dient dem Nachweis von Kalk im Gewebe.

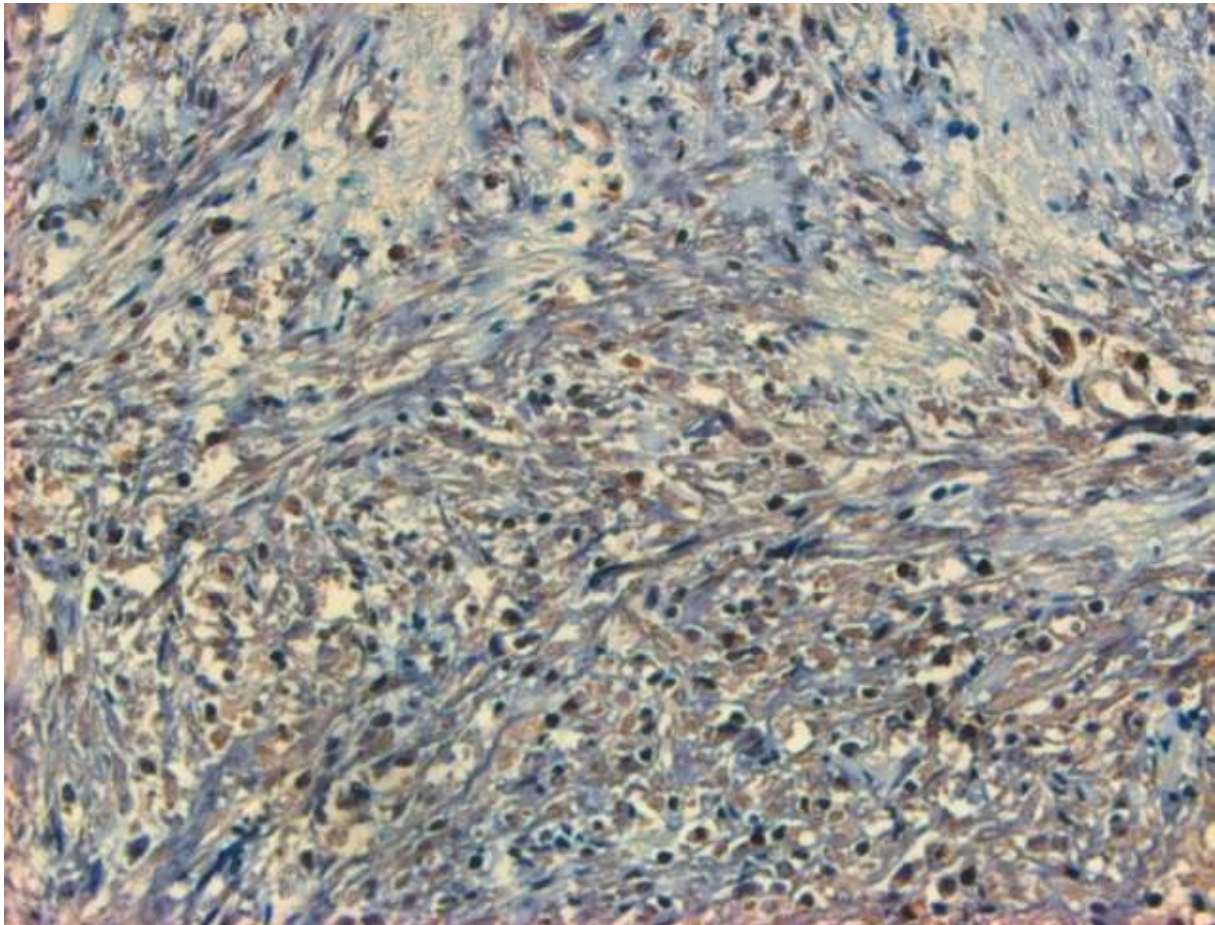
Dafür wurde das Präparat zunächst in Xylol, einer absteigenden Alkoholreihe und destilliertem Wasser entparaffiniert und rehydriert. Die Anfärbung des Kalks erfolgte durch ein dreistündiges Bad in einer 5%igen Silbernitratlösung. Danach wurden die Schnitte dreimal für je fünf Minuten in destilliertes Wasser getaucht.

Anschließend erfolgte die Färbung mit 1%igem Pyrogallol für etwa eine Minute, bevor die Präparate wieder dreimal für je fünf Minuten in destilliertem Wasser gespült wurden. Die Fixierung erfolgte mit 5%igem Natrium-Thiosulfat für fünf Minuten, gefolgt durch zehnmütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser sowie für fünf Minuten in destilliertem Wasser. Schließlich erfolgte noch die Gegenfärbung mit Kernechtrot für zehn Minuten, gefolgt von erneutem Spülen in destilliertem Wasser. Zuletzt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden

Alkoholreihe und durch dreimaliges Eintauchen in Xylol für je fünf Minuten dehydriert und schließlich mit Eukitt versiegelt.

Durch die Färbung erscheinen Kalkbildungen im Gewebe dicht schwarz, Zellkerne sind dunkelbraun, Zytoplasma ist hellbraun angefärbt (Abb. 7).

#### 2.4.9 Immunfärbung



**Abb. 8:** CD 68 (Darstellung von Makrophagen), Tier 1, Stentbett, 20-fache Vergrößerung  
Makrophagen sind braun gefärbt, übriges Gewebe ist blau, Zellkerne dunkelblau.

Die immunhistochemische Färbung erlaubt einen spezifischen Nachweis unterschiedlicher Zellen. Die nachzuweisenden Zellen zeigen jeweils individuelle Transmembranproteine, die zu dem sogenannten Cluster of Differentiation (CD) zählen. So sind für Leukozyten CD45, für Makrophagen CD68, für T-Zellen CD3 und B-Zellen CD20-Transmembranproteine spezifisch. Diese wurden durch den Färbeprozess jeweils sichtbar gemacht. Dafür band zunächst ein primärer Antikörper an dem spezifischen Transmembranprotein der Zellen. An diesen Antikörper wiederum konnte sich der zweite Antikörper, ein Immun-Peroxidase-Polymer binden, welches

schließlich die Umwandlung eines Chromogen-Substrates erlaubte, wodurch die spezifische Anfärbung entstand.

Dafür wurden die Schnitte in Xylol vom Paraffin befreit und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe und destilliertem Wasser rehydriert. Um die Bindungsstellen für die Antikörper zu demaskieren, wurden die Schnitte in der Mikrowelle dreimal für fünf Minuten in Citratpuffer gekocht. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, wurden sie in destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde die endogene Peroxidase gehemmt, indem die Präparate in eine 3%ige Wasserstoffperoxid-Methanol-Mischung getaucht wurden. Im Anschluss wurde das Präparat mit Ziegenserum benetzt und für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Antigene blockiert. Danach wurde das Serum abgekippt und der erste Antikörper aufgebracht. Die Präparate wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch dreimaliges Eintauchen der Schnitte in phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) für je fünf Minuten unterbrochen. Danach wurde die überstehende Flüssigkeit von den Präparaten abgesaugt, bevor der zweite Antikörper aufgebracht wurde und für 45 Minuten in einer feuchten Kammer einwirkte. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Danach wurde das DAB-Chromogen für zehn Minuten aufgetragen und die Präparate wiederum dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen. Schließlich erfolgte eine dreiminütige Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun, gefolgt von fünfminütigem Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Zuletzt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie in Xylol dehydriert und mit Eukitt eingedeckelt. Zur Erfolgskontrolle wurde in jedem Färbedurchgang eine Probe von Tonsillen-Gewebe mit angefärbt und ausgewertet.

Das Ergebnis ist eine Färbung, in der die gesuchten Zellen braun, das übrige Gewebe blau angefärbt ist. Zellkerne erscheinen dunkelblau bis schwarz (Abb. 8).

## 2.5 Auswertung

Zur besseren Beurteilung der potenziell pathologischen Schnitte der Versuchstiere, erfolgte eine Färbereihe mit Proben eines gesunden Referenz-Schweines. Alle gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop in 10-, 20- und 32-facher Vergrößerung betrachtet. Mit Hilfe einer

an das Mikroskop gekoppelten Kamera konnten prägnante Ausschnitte fotografiert und dokumentiert werden. Soweit es das Schnittbild erlaubte, wurden in allen Färbungen die gleichen Abschnitte beurteilt und dokumentiert.

Die HE-Färbung erlaubte einen ersten Überblick über das Präparat. Sie ermöglichte einen Eindruck vom Aufbau des Gewebes sowie mögliche Infiltration beispielsweise von Entzündungszellen. Somit wurde bei der Auswertung auf einen physiologischen Aufbau der einzelnen Gewebeschichten und einen gleichmäßigen Faserverlauf in den bindegewebigen Anteilen geachtet. Für eine mögliche Entzündungsreaktion spräche neben einer aufgehobenen Gewebearchitektur auch das Vorhandensein gewebefremder Zellen. Hinweise auf pathologische Gewebeveränderungen, die sich aus der HE-Färbung ergaben, konnten durch Zuhilfenahme spezifischer Färbungen verifiziert werden.

Die Färbung nach Masson-Goldner erlaubte einen detaillierten Überblick und die Unterscheidung der einzelnen Gewebekomponenten, wodurch die Integrität der Architektur besser beurteilt werden konnte.

Die Elastica-van-Gieson-Färbung ermöglichte die spezifische Beurteilung der elastischen Fasern im Gewebe. Hier wurde vor allem auf den parallelen Faserverlauf und die regelhafte Ausbildung der Fasern geachtet.

Mit Hilfe der Movat-Pentachrome-Färbung konnten die einzelnen Bindegewebe-Bestandteile analysiert werden, vor allem aber erlaubte die Färbung den Nachweis von Fibrin.

In der van-Kossa-Färbung ließ sich Kalkbildung nachweisen. Hier wurde zur Beurteilung eine Gradeinteilung vorgenommen. Dafür wurde zum einen unterschieden, ob die Kalkbildungen flächig oder nur isolierten Stellen vorkamen, zum anderen, wie ausgeprägt die Kalkbildungen waren (siehe Tabelle 5).

Die Immunfärbungen erlauben einen spezifischen Nachweis der unterschiedlichen Entzündungszellen. Bei der Auswertung wurde zwecks besserer Auswertbarkeit eine Gradeinteilung vorgenommen. Grad 0 entspricht dem Nichtvorhandensein der anzufärbenden Zellen, Grad 1 steht für vereinzelt angefärbte Zellen, während Grad 2 bedeutet, dass viele Zellen im Präparat angefärbt wurden.

**Tabelle 5:** Van-Kossa-Färbung: Einteilung des Ausmaßes der Verkalkung

Ausbreitung	Grad	Ausmaß der Verkalkung
global	0	keine Verkalkung
	1	<10% der Schnittfläche
	2	10-50% der Schnittfläche
	3	>50% der Schnittfläche
regional	0	keine Verkalkung
	1	vereinzelte Spots
	2	konfluierende Verkalkung
	3	flächige Verkalkung

### 3 Ergebnisse

Zur Einordnung der histologisch gewonnen Ergebnisse werden hier ebenfalls die von der Arbeitsgruppe erhobenen perioperativen und postmortalen Befunde der einzelnen Versuchstiere zusammengefasst und zugeordnet.

#### 3.1 Tier 1

Die Operation verlief technisch komplikationslos. Intraoperativ neu aufgetretene Rhythmusstörungen vom Typ eines AV-Blocks II° persistierten auch postoperativ und waren medikamentös nicht zu behandeln. Klinisch schien das Tier dadurch jedoch nicht beeinträchtigt. Im ersten Kontroll-Transösophagealen-Echokardiographie (TEE) zeigte sich unter anderem eine Mitralstenose. Zum Zeitpunkt der geplanten 1-Monats-Kontrollen zeigte sich das Tier in einem geminderten Allgemeinzustand. Im Laufe der Untersuchungen präsentierte sich das Schwein außerdem zunehmend kreislaufinstabil, sodass der Entschluss zur Euthanasie gefasst wurde.

In der postmortalen Untersuchung zeigte sich ein entzündlich stark verändertes Herz. Das Perikard war verwachsen, die Stentklappen waren massiv verdickt und steif, sodass sie sich auch manuell nicht öffnen ließen (Abb. 9). Im linken Vorhof fand sich ein großer Thrombus mit beginnender Fibrosierung. Im Bereich des Apex war das Myokard großflächig infarziert, die Papillarmuskeln zeigten sich vergrößert und mit Ablagerungen überdeckt. Die Neochordae waren allesamt intakt, jedoch hatten sich auch hier Ablagerungen gebildet. Der Stent war über ca. 2/3 der Randfläche eingewachsen. Somit lässt sich das klinische Bild des Schweins durch eine hochgradige Linksherzinsuffizienz bei Mitralklappenstenose mit Endokarditis und Zustand nach Myokardinfarkt erklären.

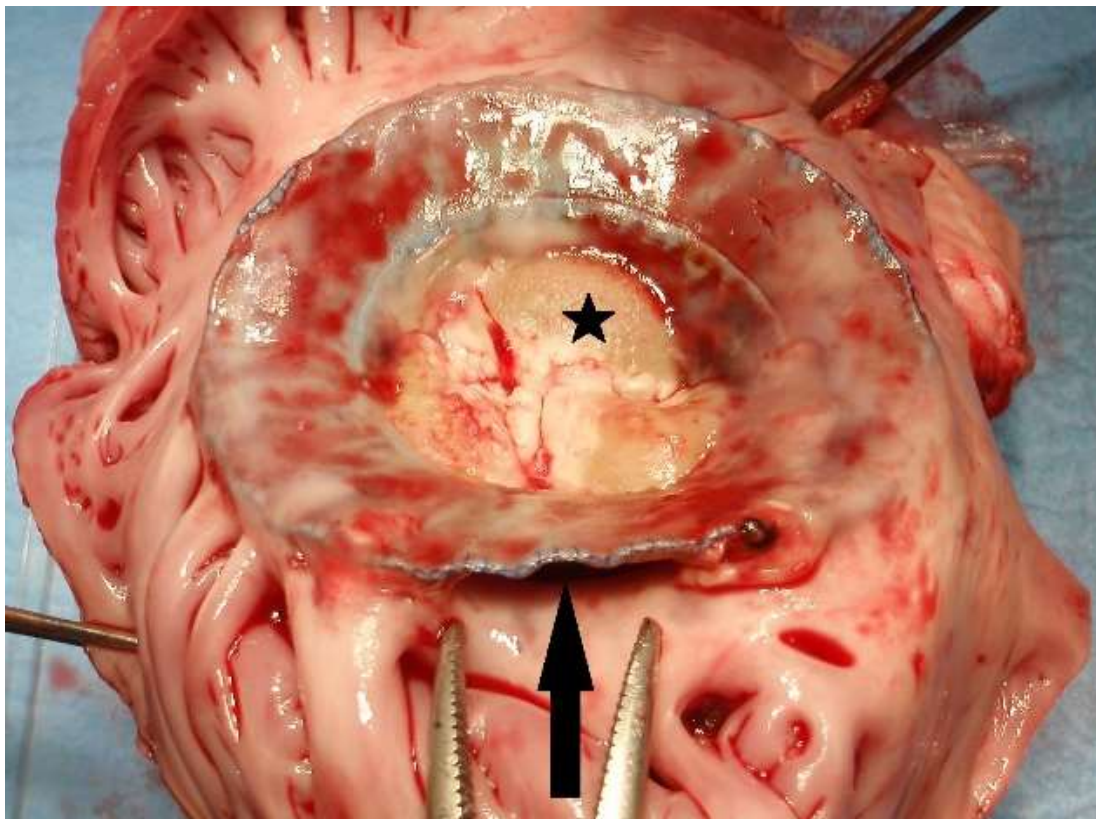
In der HE-Färbung zeigten sich neben Anschnitten mit regelhaftem Gewebeaufbau, vor allem im Bereich des Anulus auch Abschnitte mit einer sehr unruhigen Architektur, in denen das Gewebe in seiner Integrität stark gestört und zum Teil kaum noch mit physiologischen Strukturen zu vergleichen war (Abb. 10). Des Weiteren zeigten sich Hinweise auf eine Leukozyteninfiltration.

Auch die Färbungen mit Elastica-von-Gieson und nach Masson-Goldner zeigten eine teilweise aufgehobene Struktur im Zellverband, allerdings verliefen die dargestellten elastischen Fasern im Bereich des Subendothels im Atrium regelhaft parallel.

In der Movat-Pentachrome-Färbung ließ sich Fibrin vermehrt nachweisen (Abb. 11), teilweise auch in tieferen Gewebeschichten.

In der van-Kossa-Färbung fielen zum Teil konfluierende Kalk-Bildungen auf (Abb. 12). Diese waren im Bereich des Stentbetts deutlich ausgeprägter als im Bereich des Atriums. Auffallend war, dass der Kalk vor allem in Bereichen zu finden war, in dem sich zuvor auch eine ausgeprägte Fibrin-Bildung nachweisen ließ.

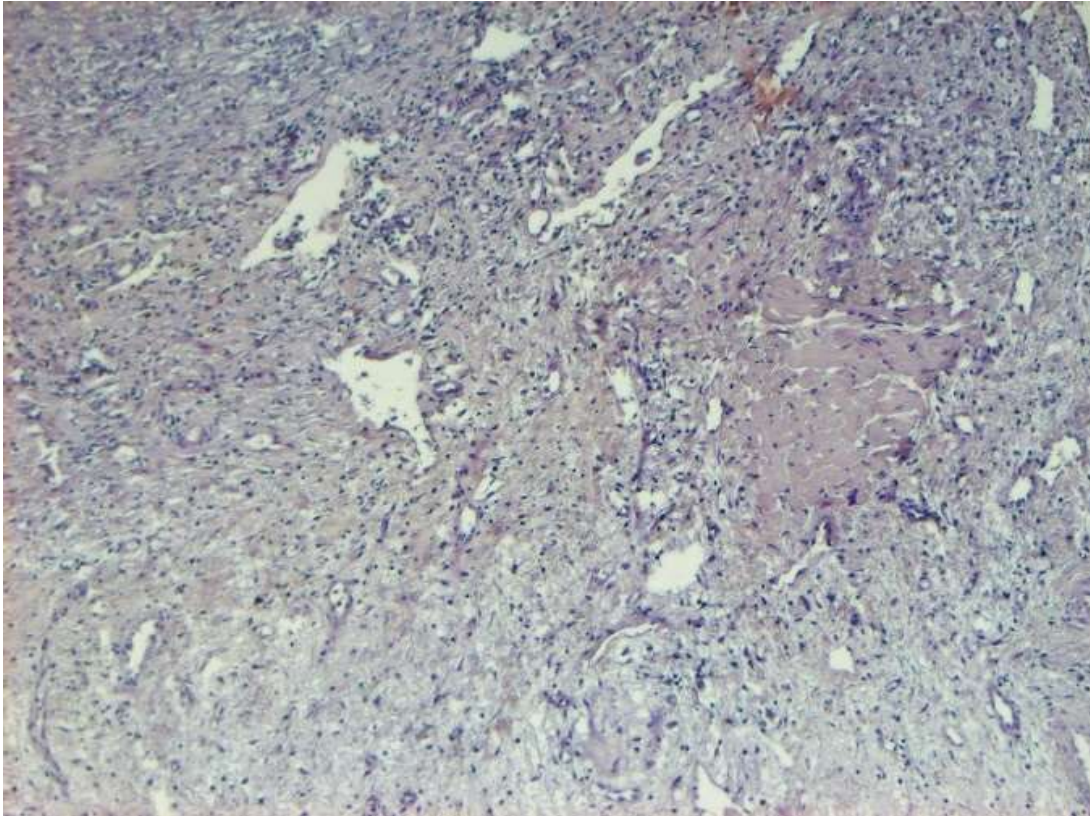
In den Immunfärbungen ließen sich viele Leukozyten nachweisen, im Atrium traten sie eher lokal konzentriert (Abb. 13), im Stentbett eher flächig auf (Abb. 14). Bei den Leukozyten handelte es sich hauptsächlich um B-Zellen und Makrophagen, T-Zellen ließen sich nur im Atrium vereinzelt nachweisen.



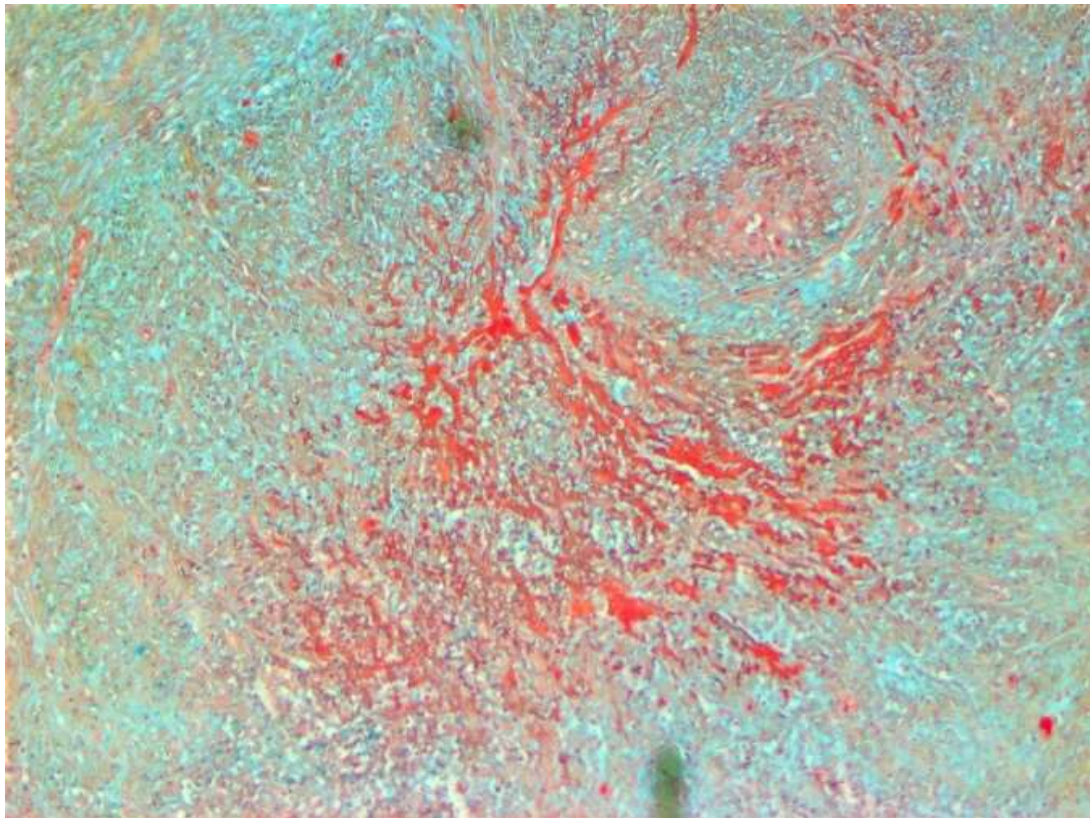
**Abb. 9: Tier 1, postmortale Untersuchung**

Aufsicht auf die implantierte Mitralklappe durch den eröffneten Vorhof. Ein großer Thrombus wurde zuvor entfernt. Die Randfläche war zu ca. 2/3 eingewachsen, allerdings zeigte sich ein großes paravalvuläres Leck (Pfeil), die Klappen waren stark verdickt und steif (Stern).

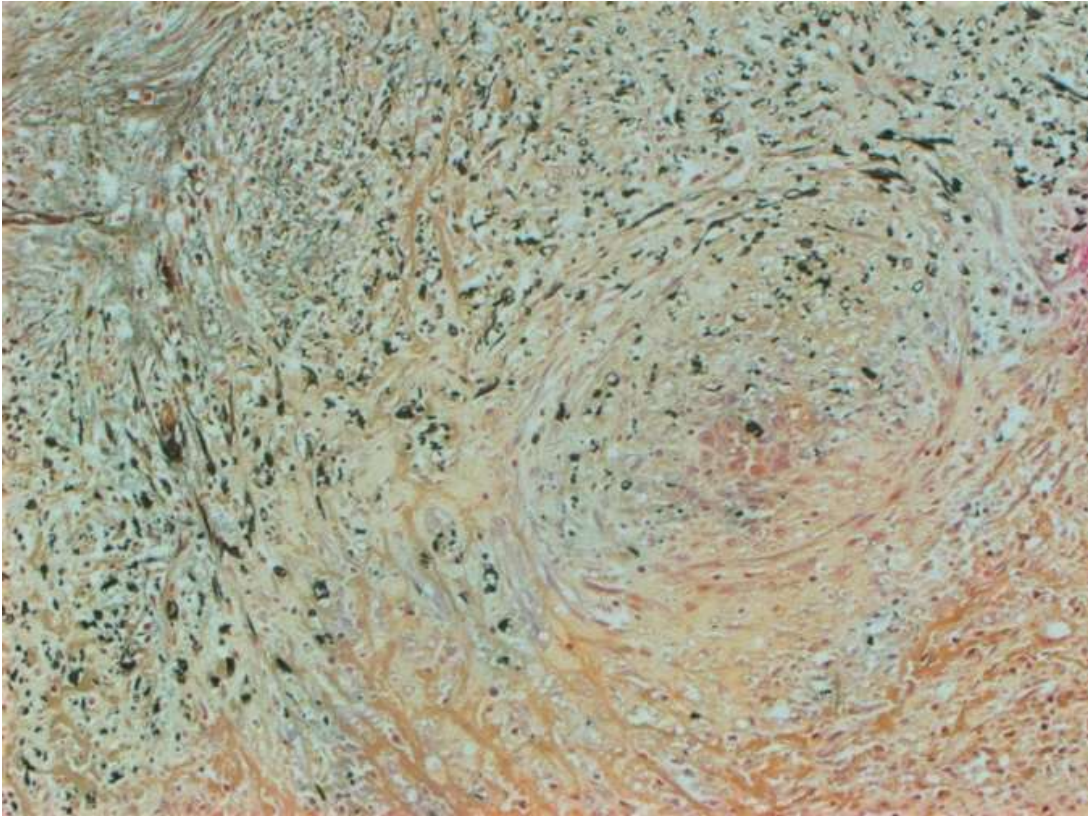




**Abb. 10: Tier 1, Stentbett, HE, 10-fache Vergrößerung**  
Hinweise auf Leukozyteninfiltration (zahlreiche blaue Zellkerne), gestörte Gewebearchitektur.

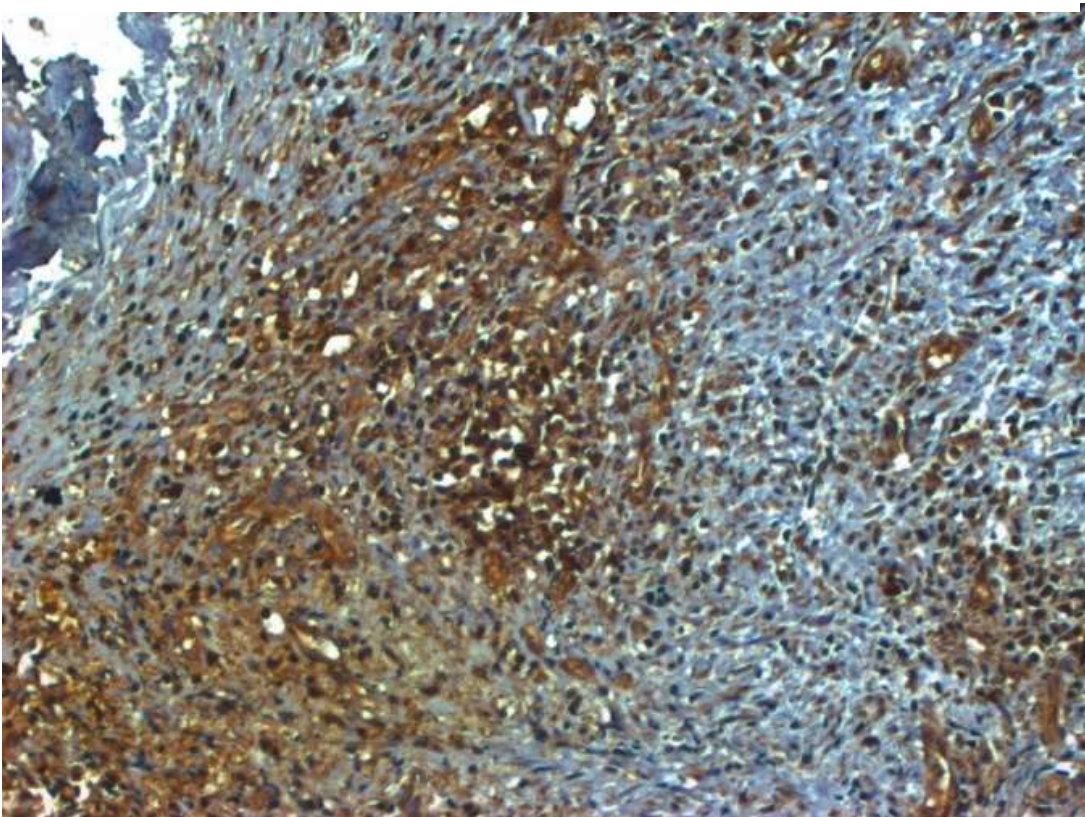


**Abb. 11: Tier 1, Stentbett, MP, 10-fache Vergrößerung**  
Nachweis konfluierender Fibrin-Bildung (rot).



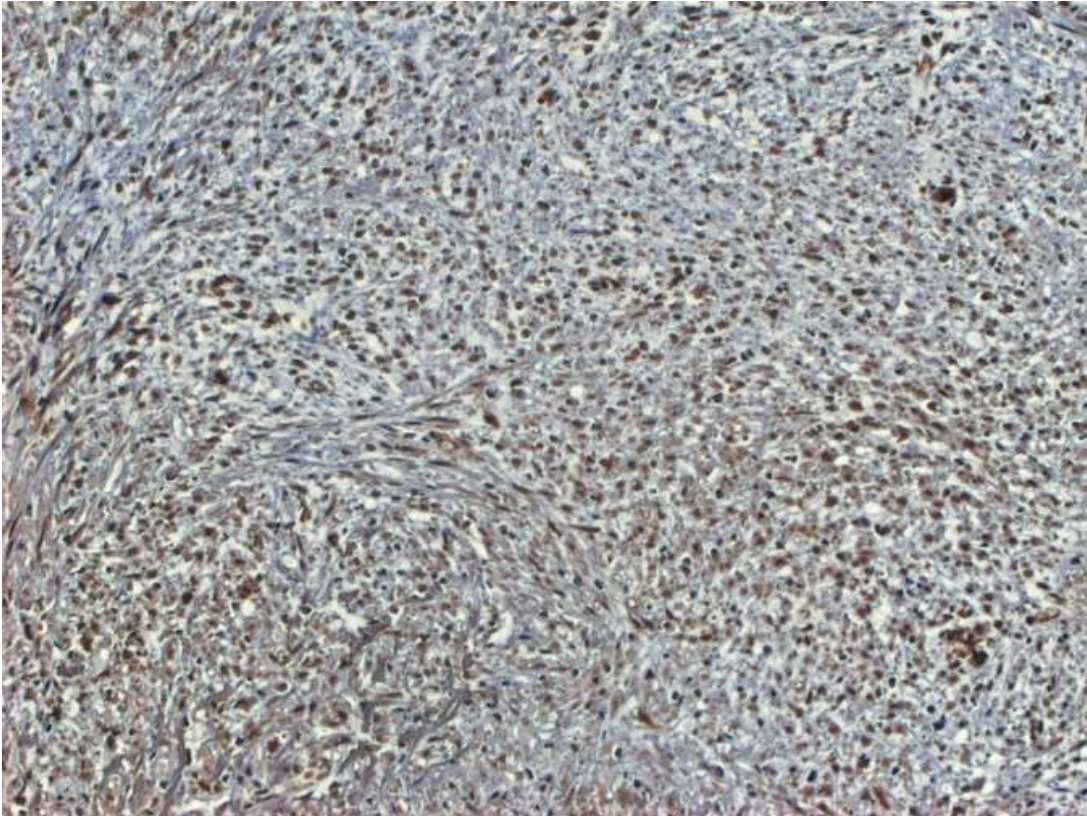
**Abb. 12: Tier 1, Stentbett, vKo, 20-fache Vergrößerung**

Nachweis von Kalk als teilweise konfluierende, schwarze Flecken (global 2, regional 2).



**Abb. 13: Tier 1, Atrium, CD45, 20-fache Vergrößerung**

Nachweis zahlreicher Leukozyten (braun, Grad 2) in lokaler Konzentration. Außerdem fehlender epithelialer Abschluss des Gewebes zum Lumen hin (linke, obere Ecke).



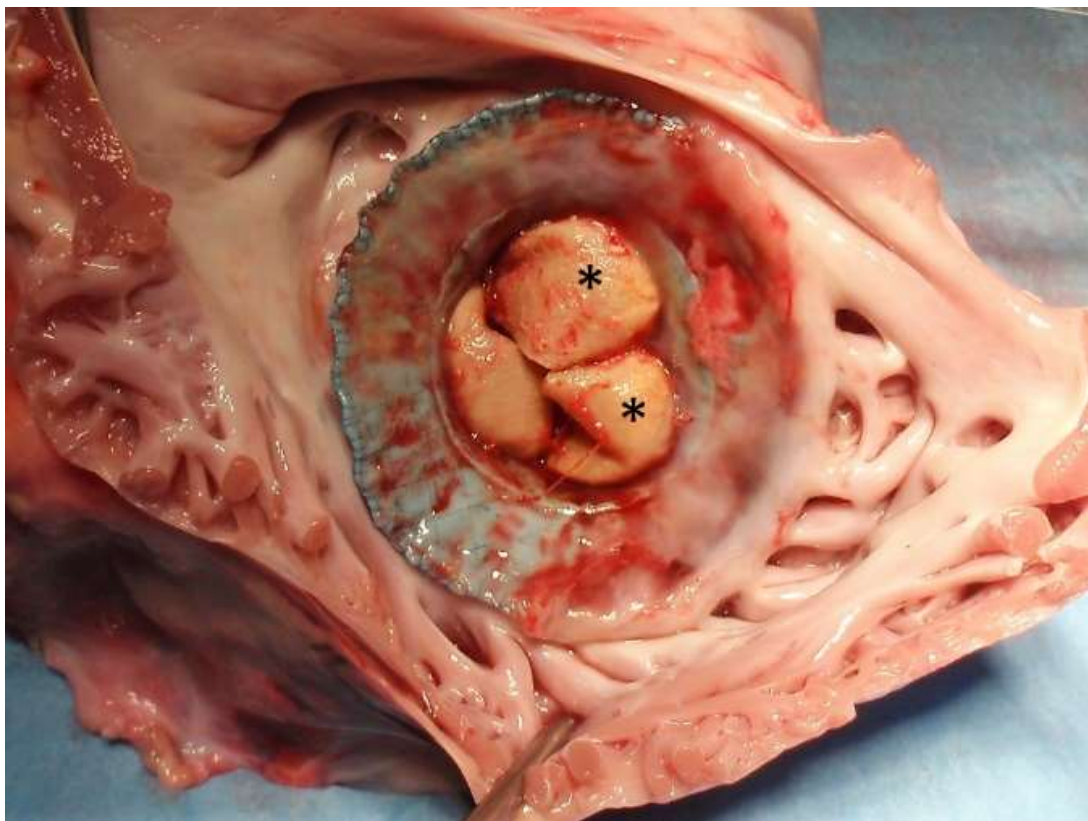
**Abb. 14: Tier 1, Stentbett, CD20, 20-fache Vergrößerung**

Nachweis zahlreicher B-Lymphozyten (braun, Gard 2), flächige Verteilung im Gewebe.

### 3.2 Tier 2

Nach Implantation des Stents zeigte sich der postoperative Verlauf ohne Auffälligkeiten. Die 4 Wochen postoperativ durchgeführten Kontrolluntersuchen an dem klinisch unauffälligen Tier zeigten Hinweise auf eine Mitralstenose und einen Perikarderguss, welche sich in CT-Aufnahmen bestätigten. Auf Grund dieser Befunde wurde die Indikation zur Euthanasie gestellt.

In der postmortalen Untersuchung zeigte sich das Perikard mit zahlreichen fibrinösen Verklebungen und Thromben. Ein Perikarderguss hatte sich gebildet, welcher den rechten Ventrikel komprimierte. Im Bereich der Stentklappe zeigten sich Zeichen einer Endokarditis, zwei der drei Klappen waren versteift (Abb. 15), woraus die Mitralstenose resultierte. Der Stent war auf ca. 2/5 der Randfläche eingewachsen.



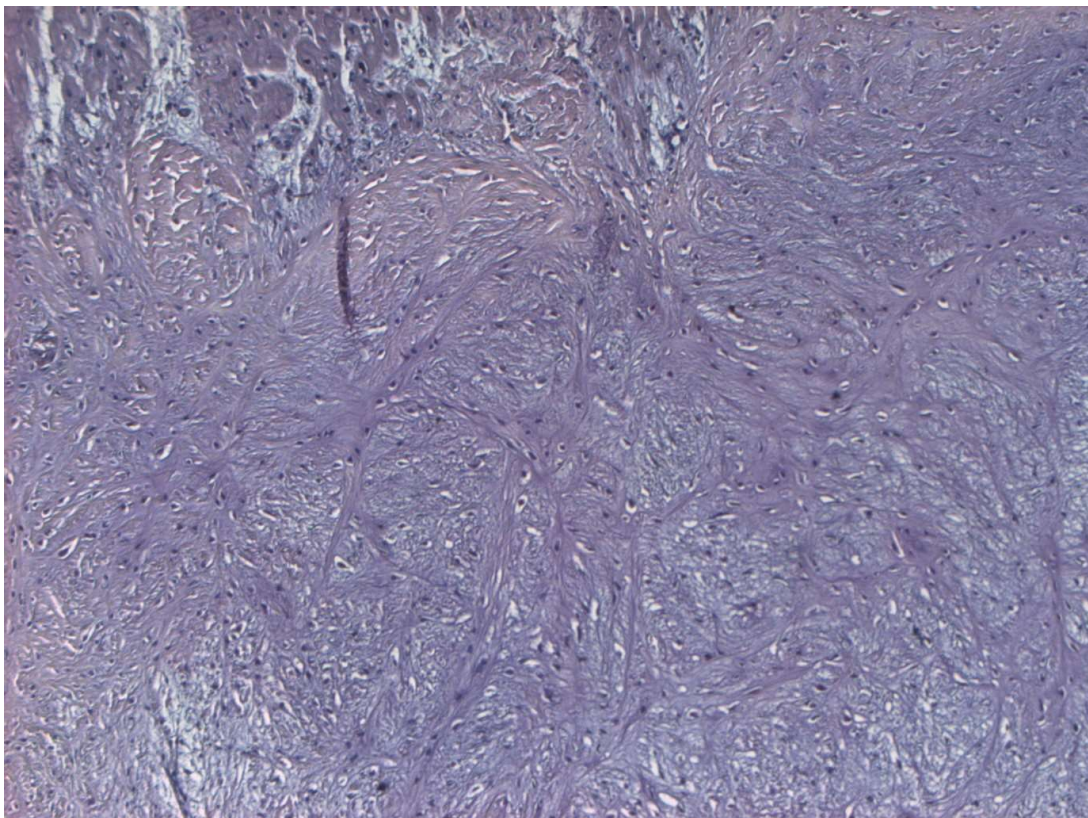
**Abb. 15: Tier 2, postmortale Untersuchung**

Aufsicht auf die implantierte Herzklappe durch das eröffnete Atrium. Zwei der Herzklappen (mit Stern markiert) zeigten sich verdickt und steif. Es zeigte sich eine beginnende Einwachsung des Stents.

In der histologischen Auswertung präsentierten sich in den Schnitten des Stentbetts der Anulus mit Anteilen der nativen Klappenbasis, sowie das Gewebe aus dem Vorhof. Die Schnitte zeigten zu großen Teilen bindegewebige Anteile des Gewebes. Diese präsentierten sich größtenteils geordnet, es gab aber auch Anteile, in dem der Faserverlauf sehr unruhig war (Abb. 16). Diese Fasern erwiesen sich in den weiteren Färbungen als kollagene Fasern. Elastische Fasern waren in keinem der Schnitte anzufärben. Im Bereich des Anulus ließ sich an der Klappenbasis Fibrin nachweisen (Abb. 17).

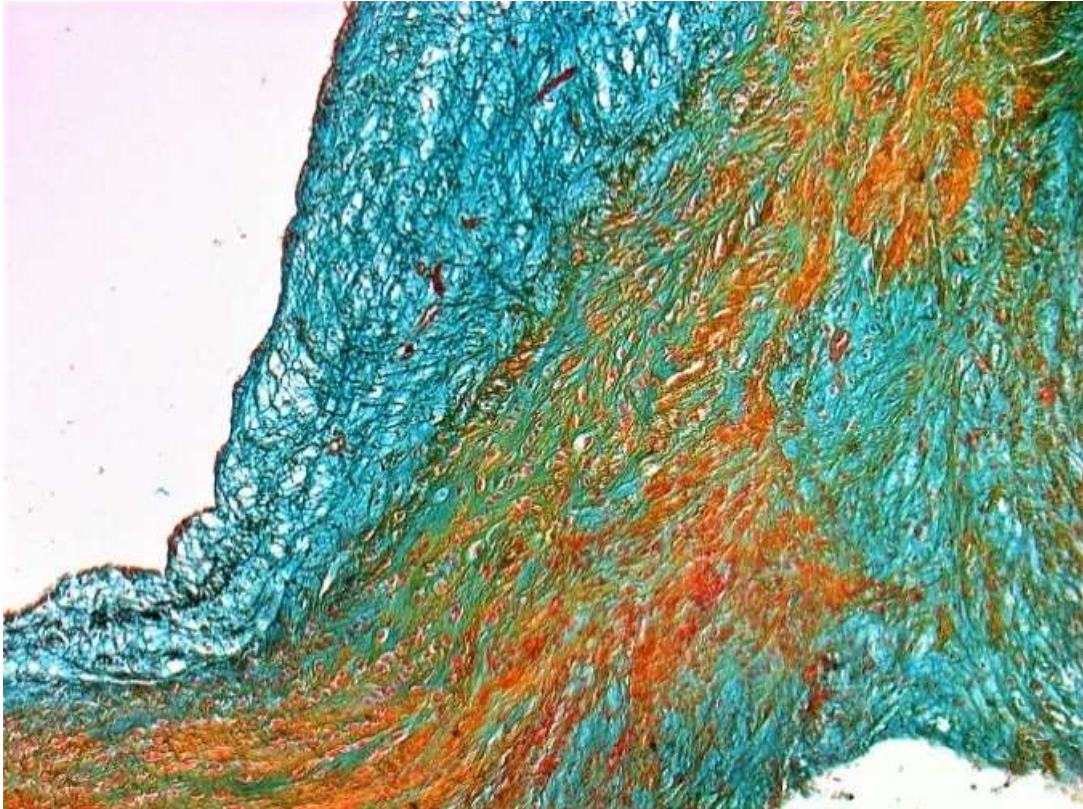
In den Immunfärbungen ließen sich CD3, 20, 45 und 68-positive Zellen jeweils vereinzelt nachweisen, die höchste Konzentration war im Bereich der Klappenbasis zu finden (Abb 18, 19). Hier ließen sich auch einzelne, kleinste Ansammlungen von Kalk nachweisen.

In den Schnitten der atrialen Verwachsung zeigte sich ein physiologischer Aufbau des Gewebes (Abb. 20). Die elastischen Fasern verliefen parallel und geordnet, Fibrin war nicht nachzuweisen. Es ließen sich nur vereinzelt CD45-positive Zellen, das heißt Leukozyten anfärben. CD3, CD20 oder CD68-positive Zellen waren nicht nachweisbar, auch Kalk konnte nicht angefärbt werden.



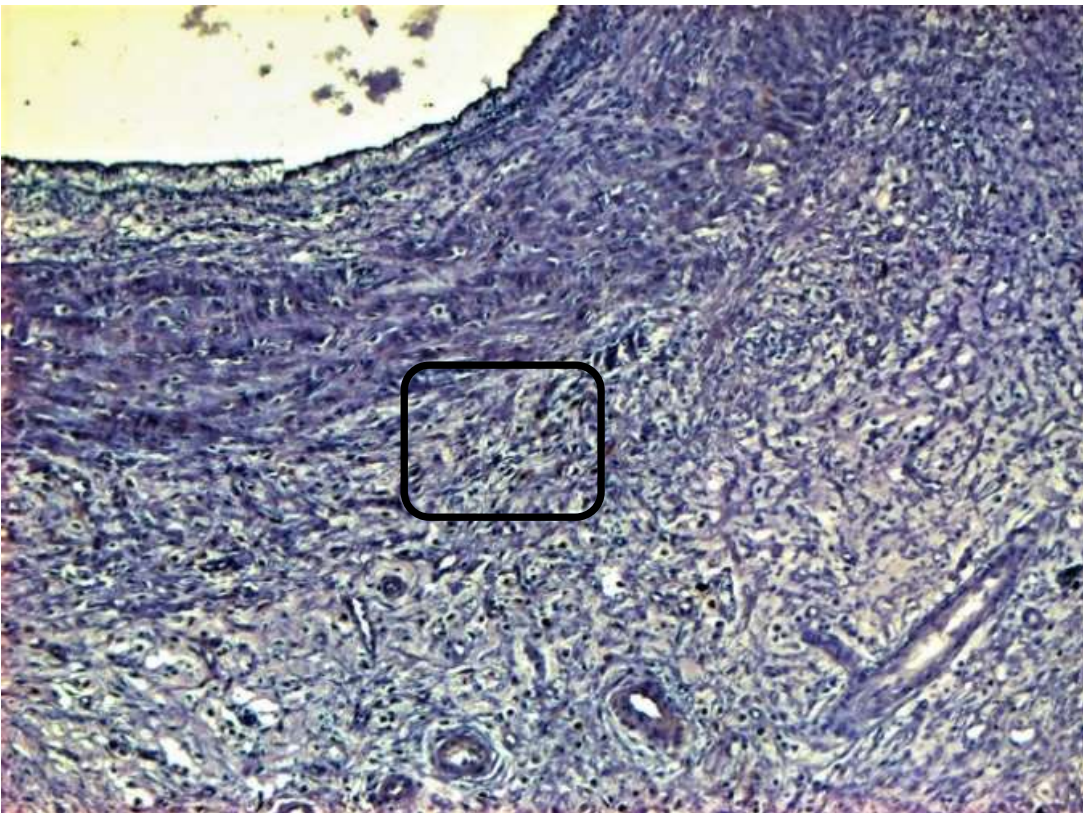
**Abb. 16: Tier 2, Stentbett, HE, 10-fache Vergrößerung**

Anschnitt mit hohem bindegewebigen Anteilen. Der Faserverlauf zeigt sich unregelmäßig.



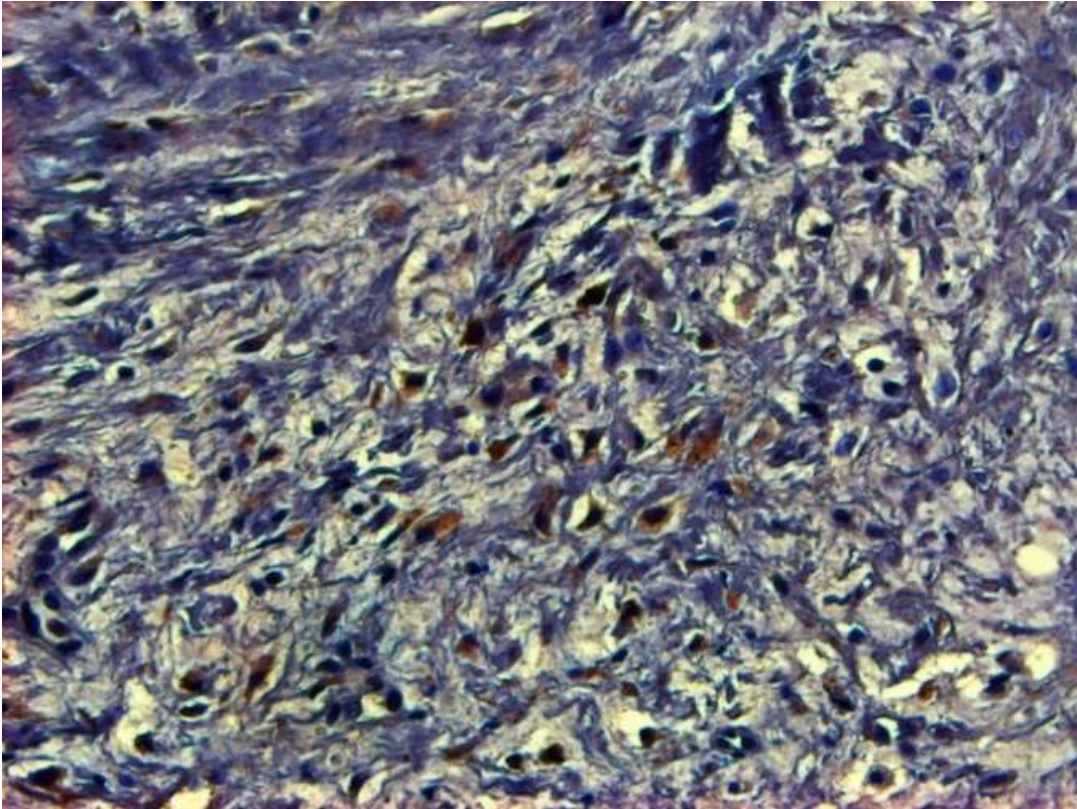
**Abb. 17: Tier 2, Stentbett, MP, 10-fache Vergrößerung**

Darstellung der Klappenbasis mit kollagenen Anteilen (gelb). Innerhalb der kollagenen Fasern ist Fibrinbildung nachzuweisen (rot).

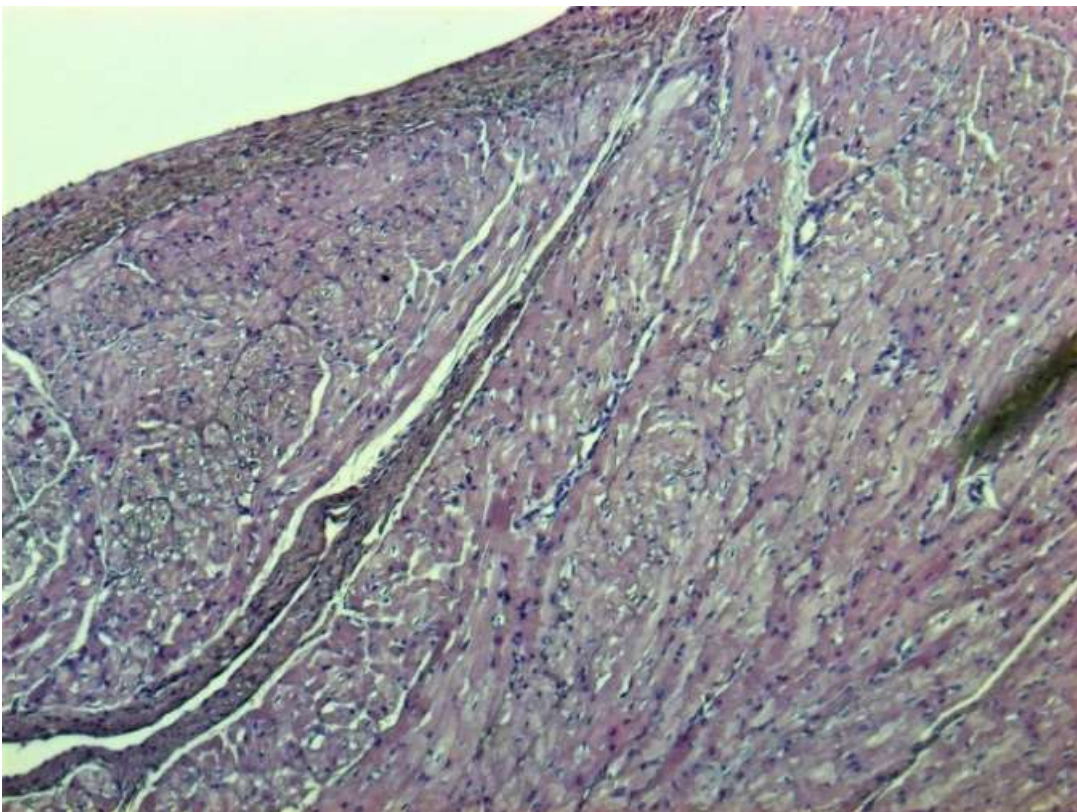


**Abb. 18: Tier 2, Stentbett, CD45, 10-fache Vergrößerung**

Nachweis von Leukozyten (braun, Grad 1) an der Klappenbasis. Siehe Detailansicht (schwarzer Rahmen) in Abb. 19.



**Abb. 19: Tier 2, Stentbett, CD45, 32-fache Vergrößerung**  
Detailansicht aus Abb. 18 mit Darstellung vereinzelter Leukozyten (braun).



**Abb. 20: Tier 2, Verwachsung atrial, HE, 10-fache Vergrößerung**  
Das an den Stent grenzende Gewebe zeigt einen physiologischen Aufbau, der epitheliale Anteil ist intakt, regulärer Aufbau des Myokards. Gefäß-Anschnitt im linken unteren Bildanteil.

### 3.3 Tier 3

Während des Eingriffes zur Stentimplantation traten Herzrhythmusstörungen auf, welche perioperativ behoben werden konnten. Eine Woche postoperativ trat ein diskretes Herzgeräusch auf, das Tier schien jedoch nicht beeinträchtigt zu sein.

In den Routineuntersuchungen nach einem Monat zeigten sich unter anderem Hinweise auf eine Mitralstenose. Im Rahmen der CT -Untersuchung kam es zu einem akuten Herz-Kreislauf-Versagen des Tieres, die sich anschließende Reanimation blieb ohne Erfolg.

Die postmortal durchgeführte Untersuchung zeigte ein mit dem Herzen verklebtes Perikard ohne Hinweise auf eine Endokarditis. (Abb. 21)



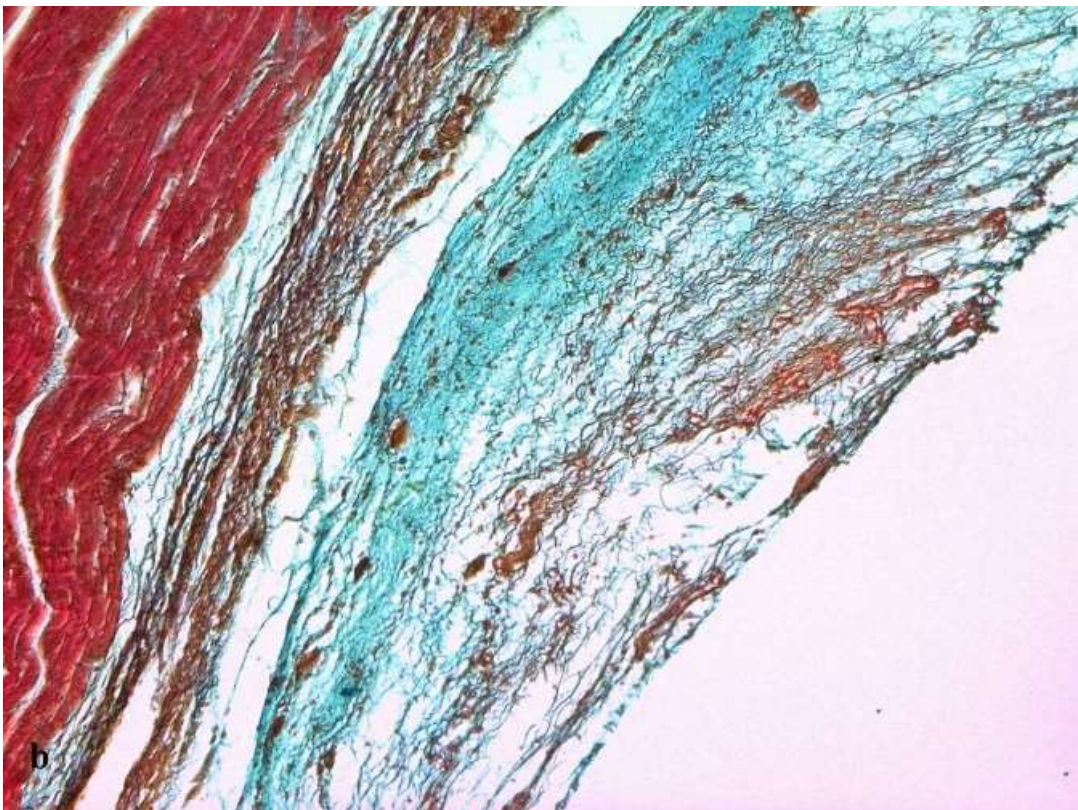
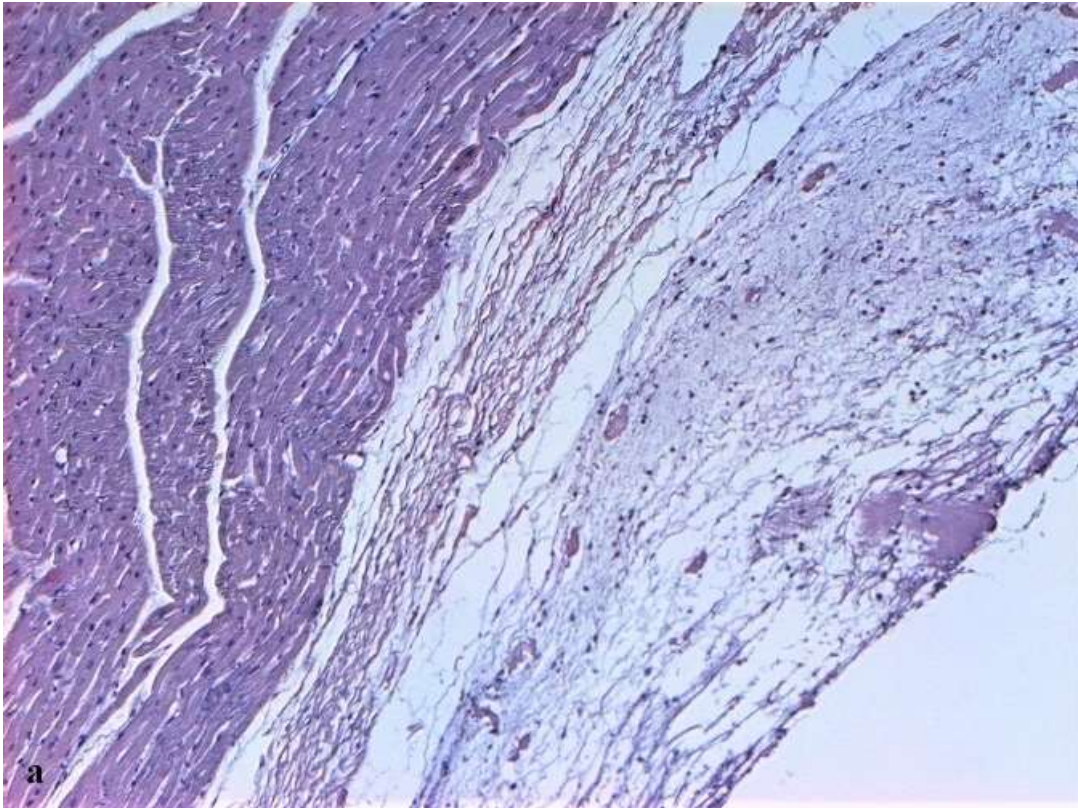
**Abb. 21: Tier 3, postmortale Untersuchung**

Aufsicht auf den herauspräparierten Mitralstent. Dieser zeigt sich unauffällig und ohne makroskopische Hinweise infektiöses Geschehen.



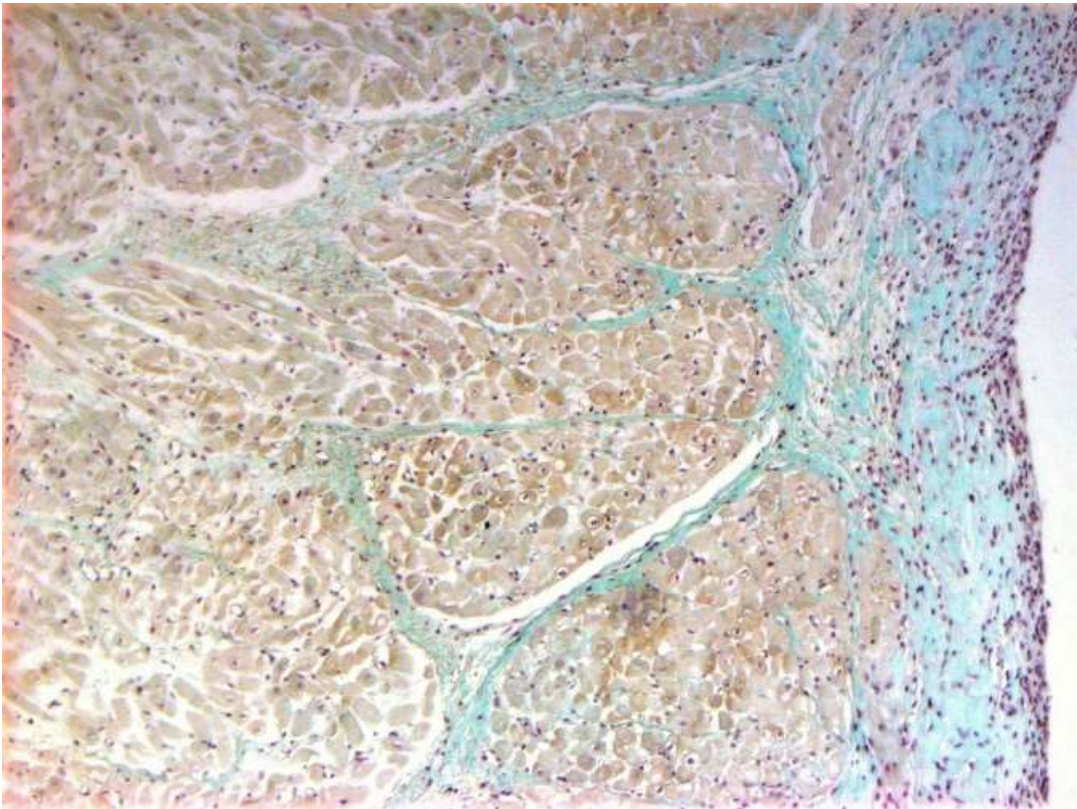
In den Gewebeproben aus dem Bereich des Stentbettes war neben dem Myokard vor allem auch das Epicard dargestellt. Hier zeigte sich ein physiologischer Aufbau des Gewebes, allerdings ließen sich zahlreiche Zellkerne als Hinweis auf Leukozyten anfärben, ebenso konnte Fibrin nachgewiesen werden (Abb. 22).

In den Immunfärbungen ließen sich teilweise vereinzelt CD45-positive Zellen anfärben (Grad 1), einzelne T-Zellen, B-Zellen oder Makrophagen ließen sich nicht nachweisen. Im Bereich der atrialen Einwachsung konnte man neben regelhaft angeordnetem Gewebe (Abb. 23) auch Abschnitte mit einer bindegewebigen „Wucherung“, in der sich in der Movat -Pentachrome-Färbung vermehrt Fibrin nachweisen ließ, finden. In den Immunfärbungen war vor allem dieser Gewebeabschnitt reich an Leukozyten (Abb. 24), dabei vor allem B-Zellen. Auch Makrophagen ließen sich darstellen, T-Zellen kamen nur vereinzelt vor. Kalk ließ sich in keiner Gewebeprobe dieses Tieres nachweisen.



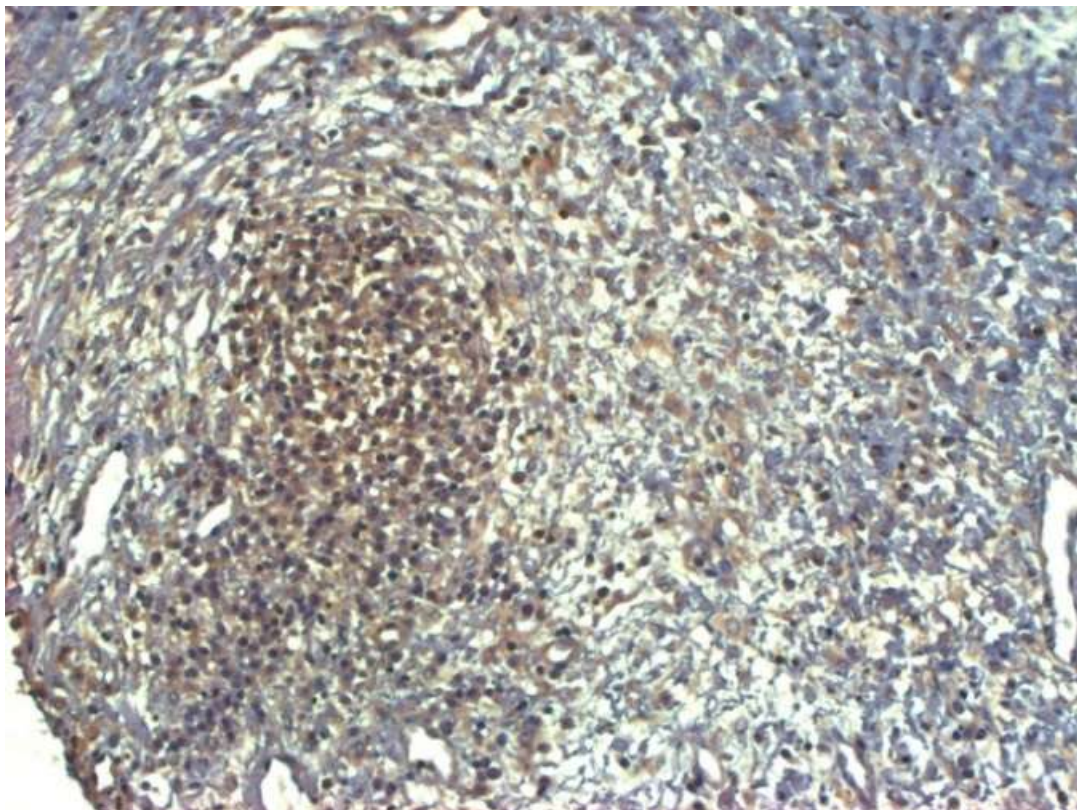
**Abb. 22: Tier 3, Epikard, HE (a) und MP (b), 10-fache Vergrößerung**

Es zeigt sich ein weitestgehend physiologischer Aufbau des Gewebes. In den oberflächlichen Anteilen des Epikards zeigen sich einzelne, oberflächliche Verdichtungen. Im Vergleich mit der MP-Färbung (b) sind diese als Fibrinbildung zu interpretieren.



**Abb. 23: Tier 3, atriale Einwachsung, MG, 10-fache Vergrößerung**

Grundsätzlich normaler Aufbau des Vorhof-Gewebes, zahlreiche Zellkerne im Bereich des Endokards könnten auf Leukozyten hinweisen.



**Abb. 24: Tier 3, Atrium, CD45, 20-fache Vergrößerung**

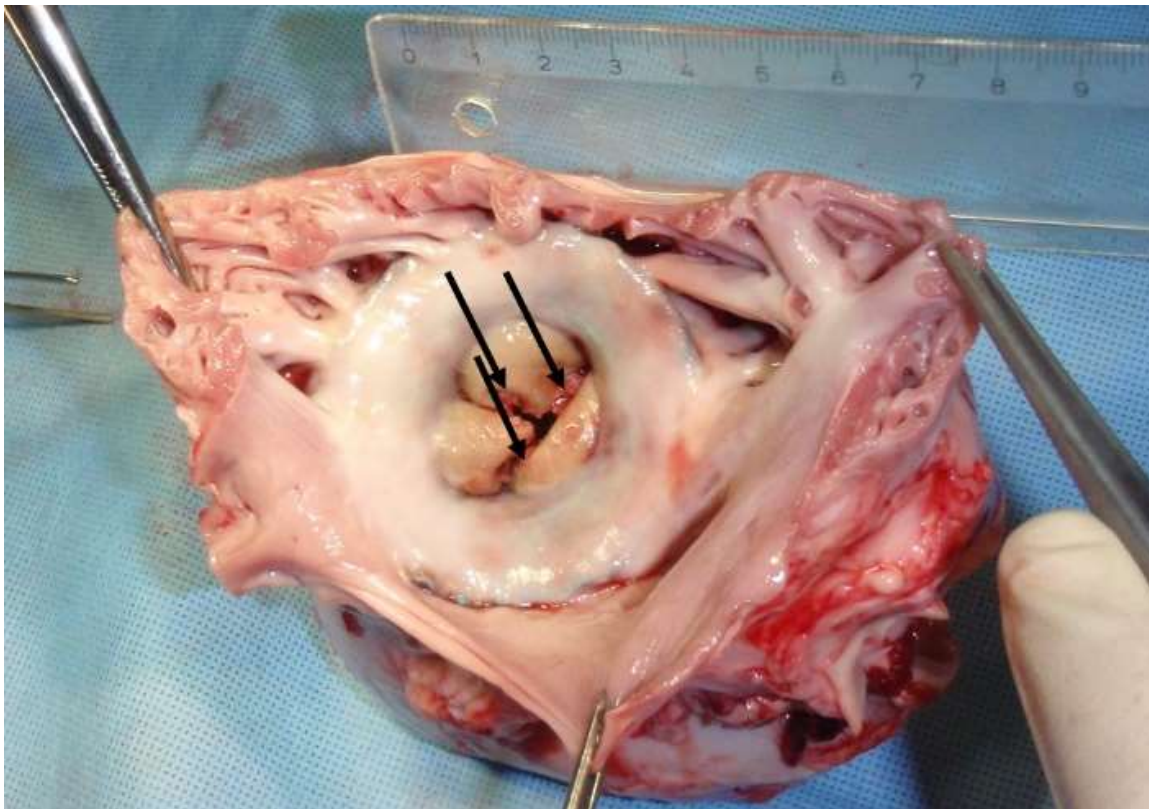
Nachweis einer lokalen Anhäufung von Leukozyten (Grad 2, braun angefärbte Zellen)

### 3.4 Tier 4

Die OP zur Stent-Implantation verlief komplikationslos. Die Untersuchungen nach einem Monat ergaben Hinweise auf eine mäßige bis schwere Mitralklappeninsuffizienz bei versteiften Klappen, das Tier erschien wesensverändert. Wenige Tage später zeigte das TEE eine milde Mitralsuffizienz, die Herzfunktion wurde als stabil eingestuft. Gleichzeitig wies das klinische Bild des Schweines den Verdacht auf eine Pneumonie auf, woraufhin eine antibiotische Therapie eingeleitet wurde.

In den zwei-Monats-Kontrolluntersuchungen zeigten sich ein persistentes PVL, eine mäßige bis schwere Mitralsuffizienz und ein vergrößerter linker Vorhof. Außerdem zeigten sich im CT ein Stentbruch sowie Hinweise auf eine chronische Pneumonie. Vor dem Hintergrund dieser Befunde wurde die Indikation zur Euthanasie gestellt.

In der postmortalen Untersuchung zeigten sich unter anderem an der Stentklappe milde Zeichen einer Endokarditis mit kleinen, subvalvulär gelegenen Kalzifikationen. Der Stent war an über 95% der Randfläche eingewachsen (Abb. 25).



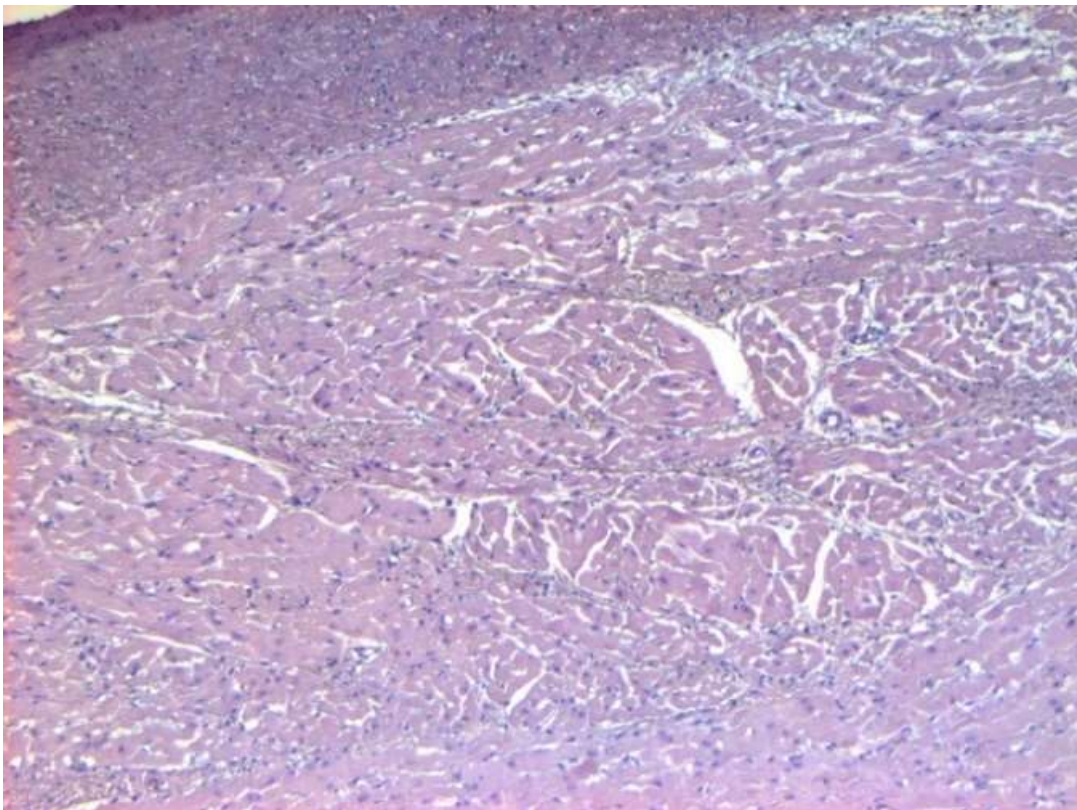
**Abb. 25: Tier 4, postmortale Untersuchung**

Aufsicht auf die Mitralklappe durch den eröffneten Vorhof. Es zeigt sich ein weitestgehend eingewachsener Stent. An den Klappen zeigen sich kleine Vitien (Pfeile) als Hinweis auf ein entzündliches Geschehen.

In den Gewebeproben des Stentbettes ließen sich Anteile des Vorhofs, der nativen Klappe sowie des atrioventrikulären Übergangs darstellen. In den Übersichtsfärbungen erschienen die Strukturen physiologisch angeordnet (Abb. 26). Die elastischen Fasern im Subendothel verliefen parallel und geordnet, Fibrin und Kalk ließen sich nicht nachweisen.

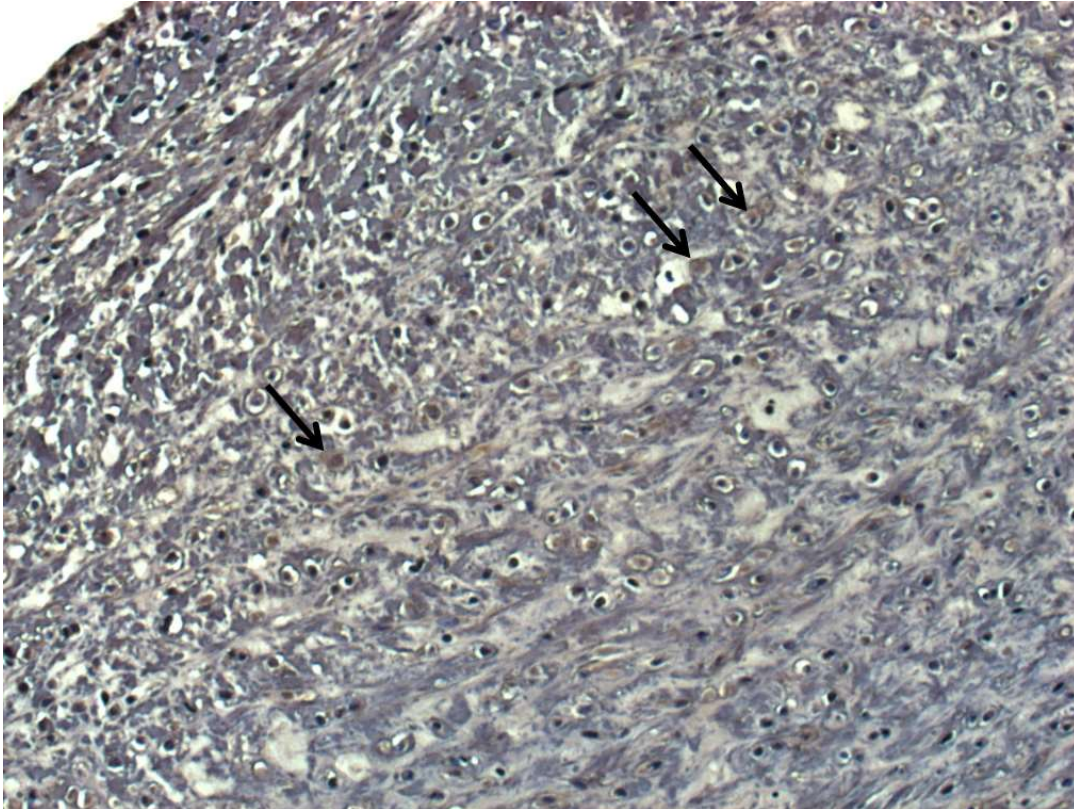
Allerdings war in den Übersichtsfärbungen der Reichtum an Zellkernen im Gewebe auffällig, sodass sich hier das Vorhandensein von reichlich Leukozyten vermuten ließ. Dies bestätigte sich in den Immunfärbungen. Hier ließen sich reichlich (Grad 2) CD45-positive Zellen nachweisen, wobei es sich vor allem um Makrophagen und B-Zellen (Abb. 27) handelte, T-Zellen waren nur vereinzelt darzustellen.

Im Bereich des Atriums ließen sich kaum Abschnitte mit einem regelhaften Gewebeaufbau nachweisen, vielmehr fanden sich hier bindegewebige Areale, die anscheinend keiner Struktur folgen. Elastische Fasern waren hier nicht nachzuweisen. Fibrin war in geringem Ausmaß vorhanden (Abb. 28), Kalk ließen sich hier nicht nachweisen. Leukozyten waren in diesem Bereich nachzuweisen, vor allem B-Zellen (Abb. 29). Makrophagen und T-Zellen (Abb. 30) waren nicht oder nur sehr vereinzelt angefärbt.



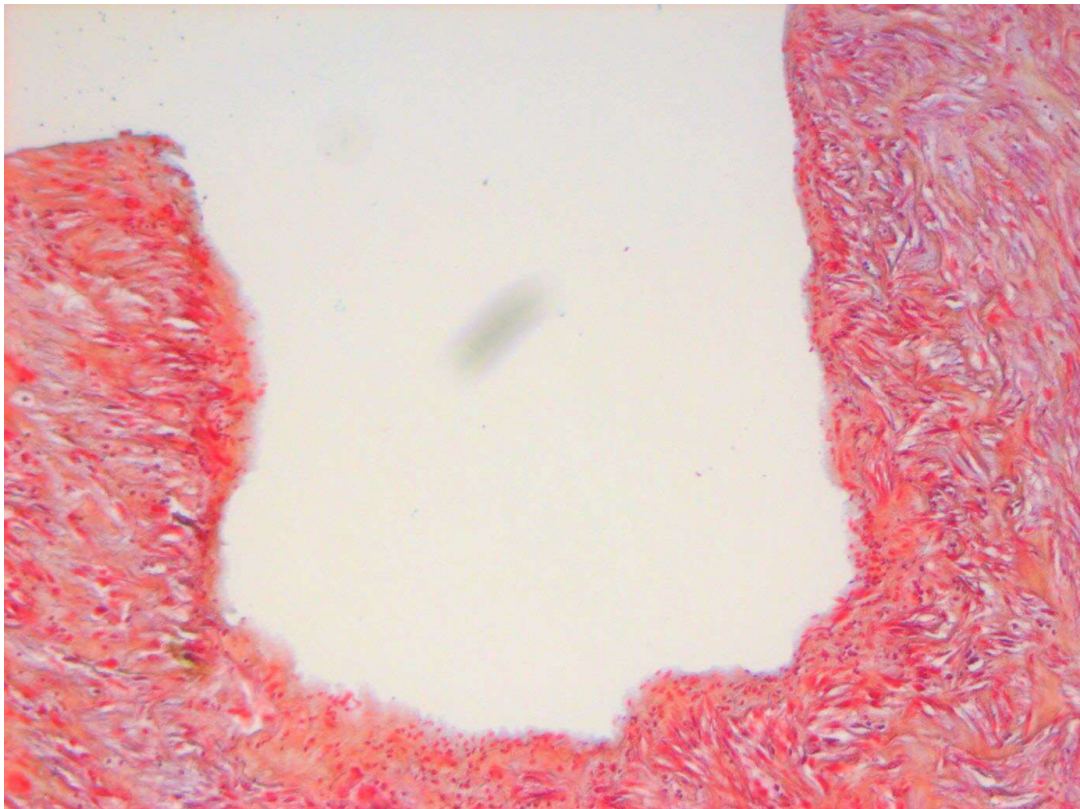
**Abb. 26: Tier 4, Stentbett, HE, 10-fache Vergrößerung**

physiologischer Aufbau, allerdings auffällig viele Zellkerne. Diese sind ein Hinweis auf eine mögliche Leukozyteninfiltration.



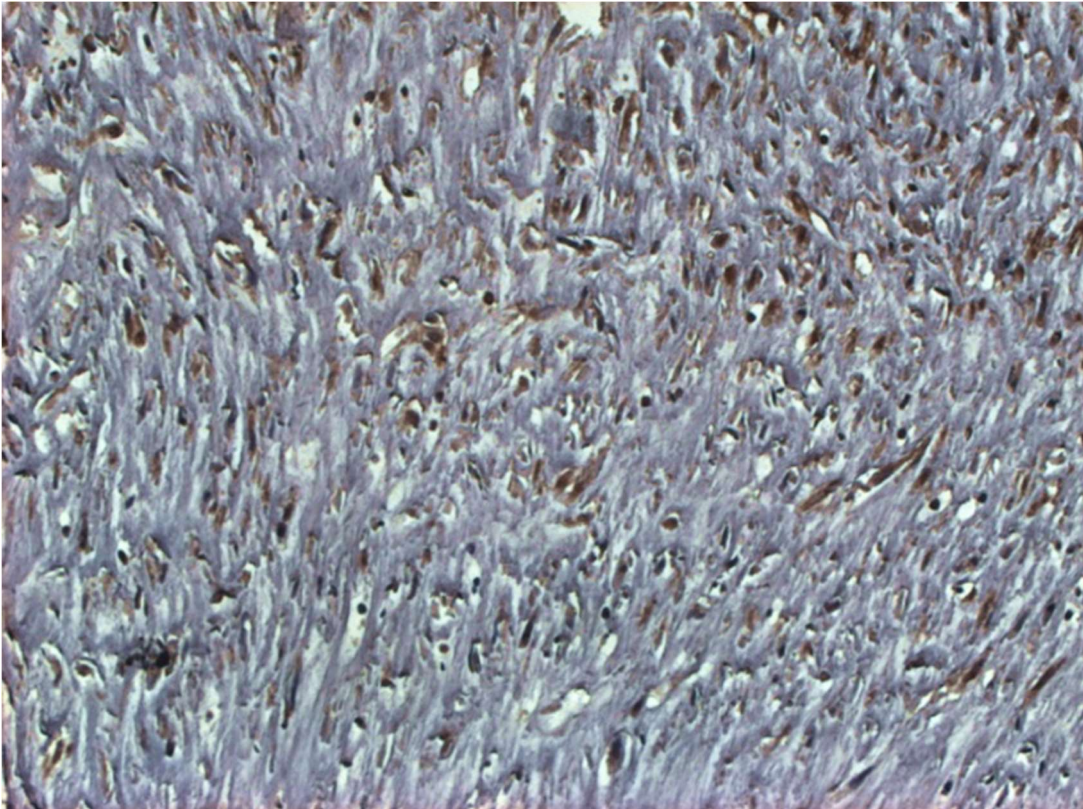
**Abb. 27: Tier 4, Stentbett, Immunfärbung CD20, 20-fache Vergrößerung**

Es zeigen sich zahlreiche bräunlich abgefärbte B-Zellen (Grad 2) (exemplarisch sind drei Zellen mit Pfeilen markiert).

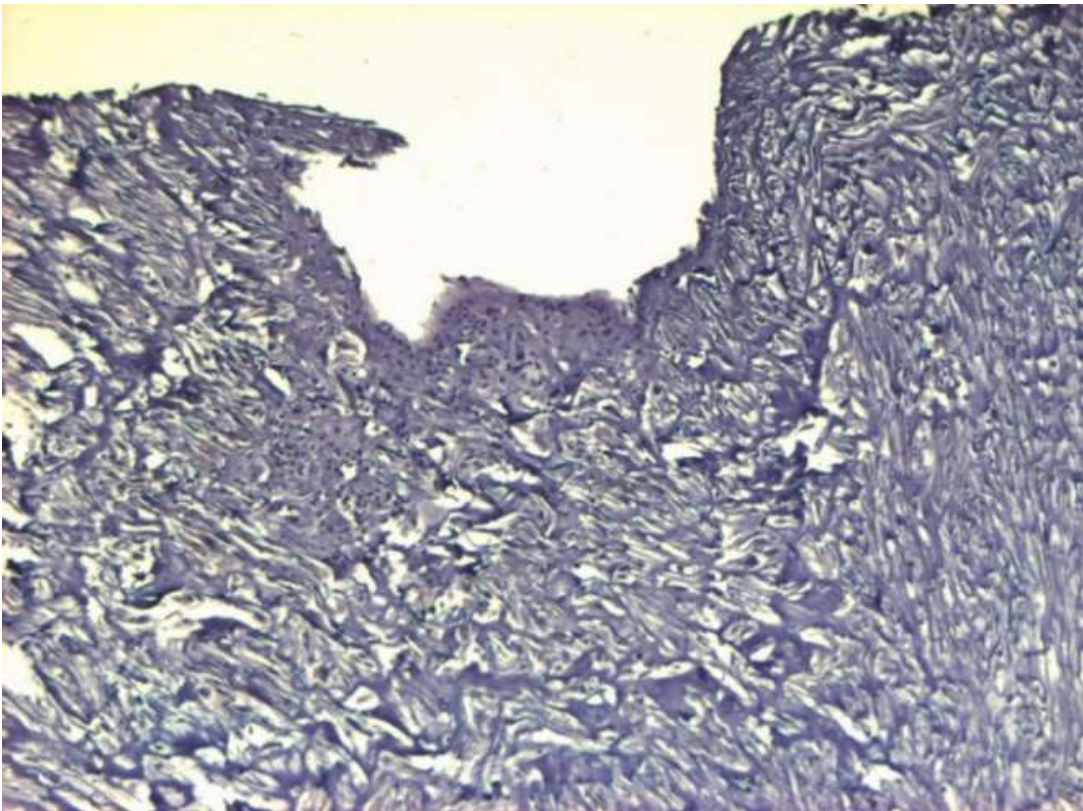


**Abb. 28: Tier 4, Atrium, MP, 20-fache Vergrößerung**

Auffallend ist das Fehlen eines strukturierten Gewebeaufbaus, neben kollagenen Fasern (gelb) lässt sich Fibrin (helles rot) nachweisen.



**Abb. 29: Tier 4, Atrium, CD20, 20-fache Vergrößerung**  
B-Zellen lassen sich als braun angefärbte Zellen nachweisen (Grad 2).



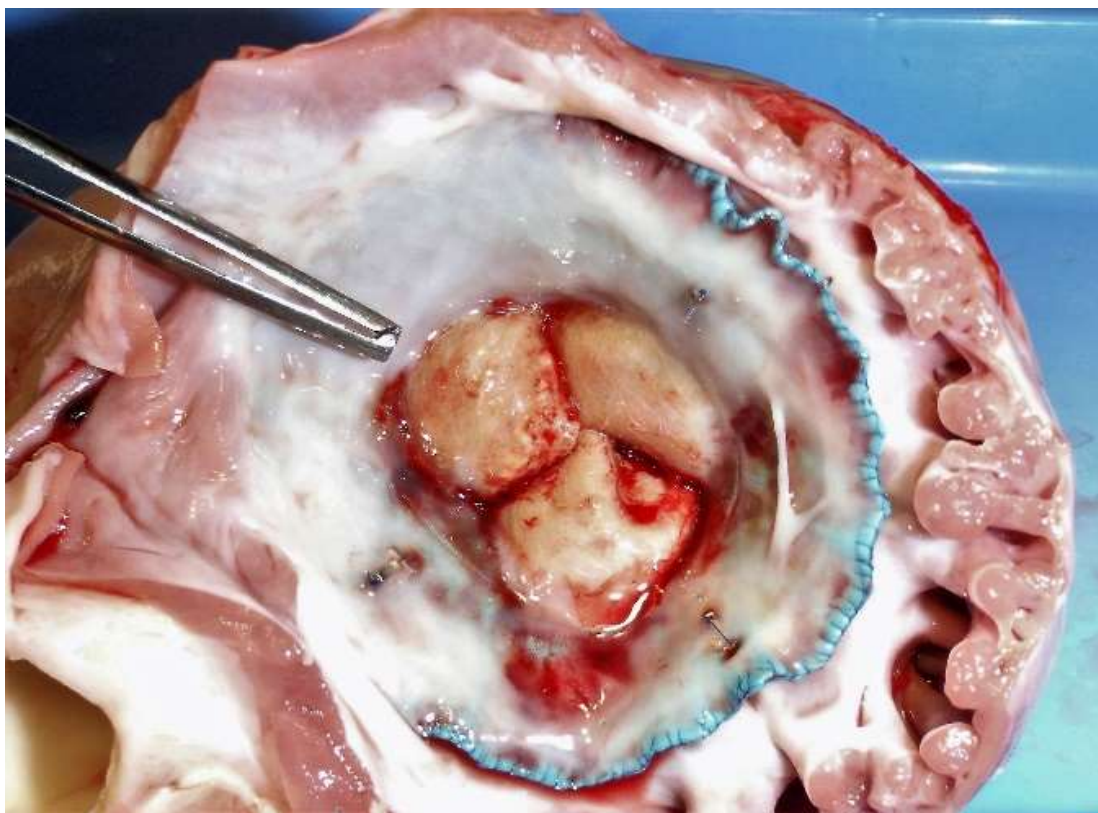
**Abb. 30: Tier 4, Atrium, CD3, 10-fache Vergrößerung**  
T-Zellen lassen sich nicht nachweisen (Grad 0).

### 3.5 Tier 5

Bei diesem Tier wurde der 110°-Stent mit drei Haken eingesetzt. Die Positionierung des Stents gestaltete sich schwierig, die Haken konnten sich nicht vollständig im Gewebe verankern. Trotzdem konnte ein zufriedenstellender Sitz des Stents erreicht werden.

Im postoperativen Verlauf schien sich das Tier klinisch gut zu erholen, allerdings stellte sich ein diskretes Herzgeräusch im Sinne einer Mitralinsuffizienz ein. Klinisch wirkte das Tier dadurch nicht beeinträchtigt. In der Routinekontrolle nach einem Monat Kontroll-TEE an dem klinisch stabilen Tier präsentierte sich ein zunehmend großes paravalvuläres Leck, weshalb die Indikation zur Euthanasie gestellt wurde.

In der postmortalen Untersuchung zeigte sich das Herz mit einem chronisch verwachsenen Perikard, die Stentklappen waren mit Fibrinauflagerungen überzogen, das posteriore Segel war zudem verkalkt (Abb. 31). Der Stentkörper war an ca. der Hälfte der Randfläche eingewachsen, es zeigten sich mehrere Stentbrüche, teilweise mit Einbrüchen ins Gewebe.



**Abb. 31: Tier 5, postmortale Untersuchung**

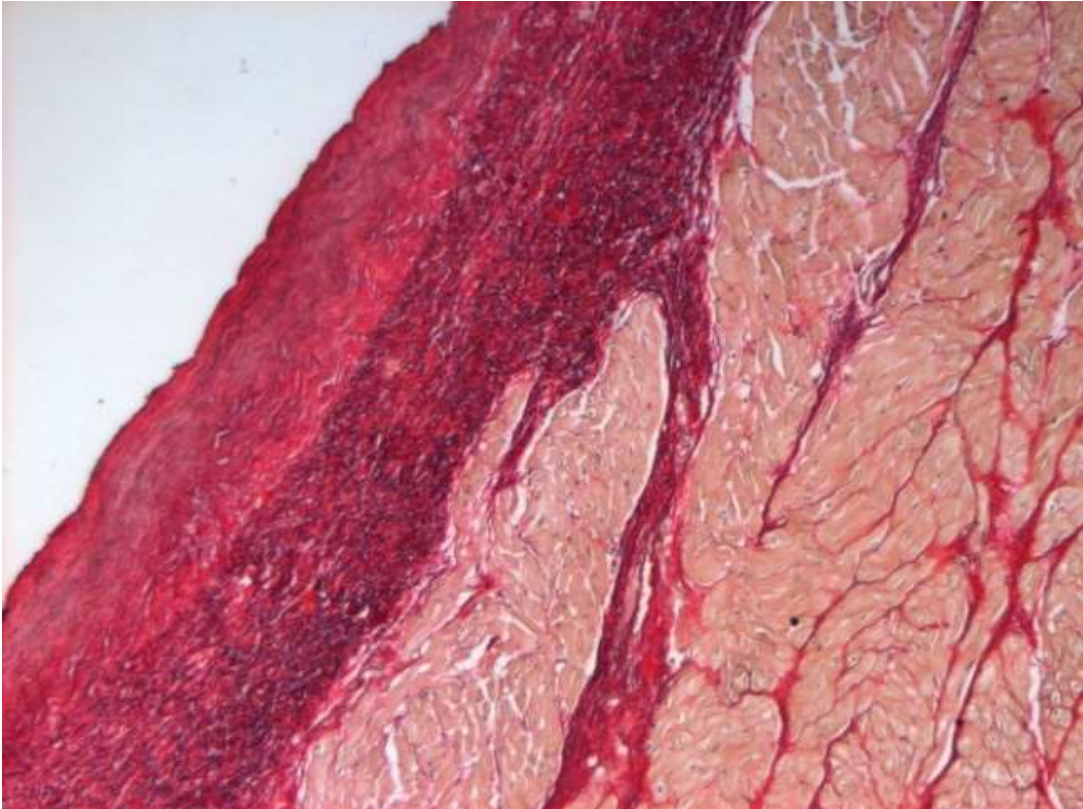
Aufsicht auf den ca. zur Hälfte eingewachsenen Mitrastent durch den eröffneten Vorhof. Die fibrösen Auflagerungen wurden entfernt. Am posterioren Segel (mit Pinzette markiert) zeigten sich Verkalkungen.



Bei diesem Tier fanden sich vor allem im Stentbett Abschnitte mit einer intakten Gewebearchitektur. Dort zeigte sich in den verschiedenen Färbungen eine physiologische Schichtung des Gewebes, das Endokard war intakt, in der Elastica-van-Gieson Färbung verliefen die elastischen Fasern geordnet und parallel (Abb. 32). Kalk war nicht anzufärben, in den Immunfärbungen ließen sich keine oder nur vereinzelte Entzündungszellen nachweisen.

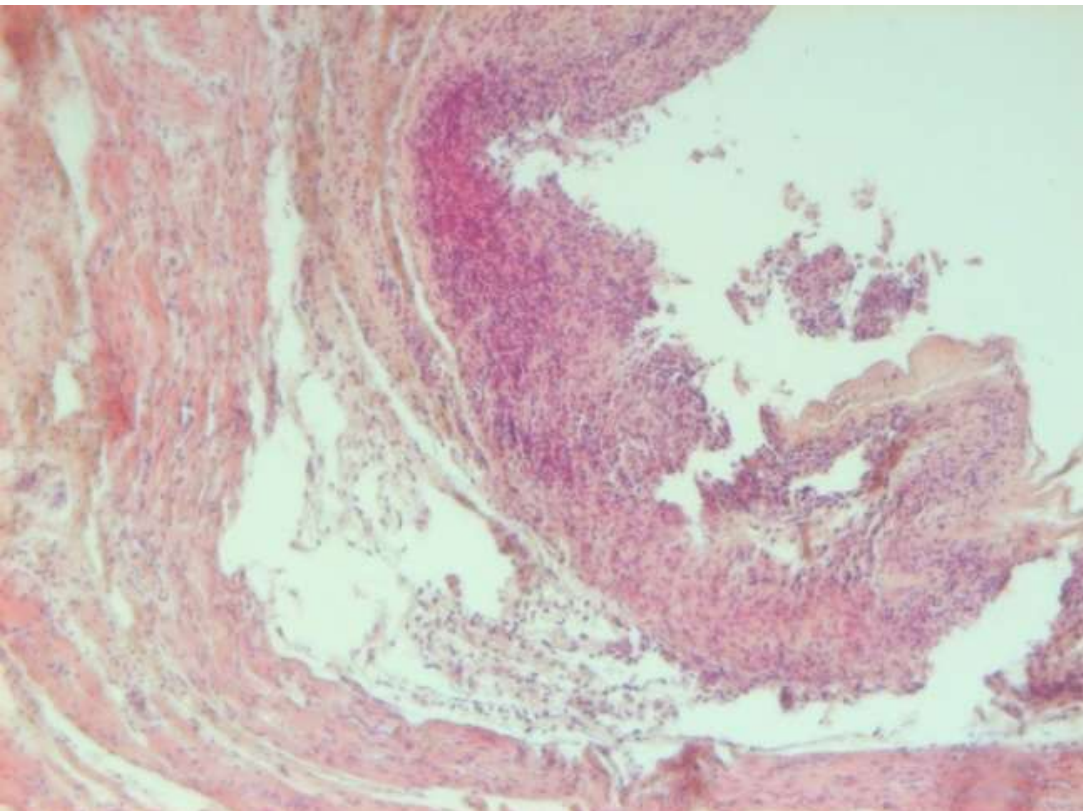
Daneben ließen sich allerdings ebenfalls in Schnitten des Stentbettes Abschnitte finden, in denen es zu einer anscheinend unstrukturierten Bildung von zellreichem Bindegewebe gekommen war. In diesen Arealen waren in den immunhistochemischen Färbungen vermehrt Immunzellen zu identifizieren, hier vor allem auch Makrophagen. Kalk war weiterhin histologisch nicht nachweisbar.

Auch im Atrium zeigten sich Abschnitte mit normalem Aufbau neben solchen, in denen es teilweise einen vollständigen Verlust des physiologischen Gewebeaufbaus gab (Abb. 33). Der Verlauf der elastischen Fasern war in diesen Bereichen deutlich ausgedünnt, in der Movat-Pentachrome-Färbung fielen zum Teil massive Fibrin-Schichten auf (Abb. 35). In diesen Bereichen imponierte das haufenweise Auftreten gewebefremder Zellen, die in den Immunfärbungen als Leukozyten identifiziert werden können (Abb. 34). In der weiteren Differenzierung ließen sich hier B- und T-Lymphozyten sowie Makrophagen in jeweils ähnlichen Ausmaßen einzeln nachweisen (Grad 1). Im Bereich des nativen Klappenansatzes ließen sich minimale Verkalkungen nachweisen.



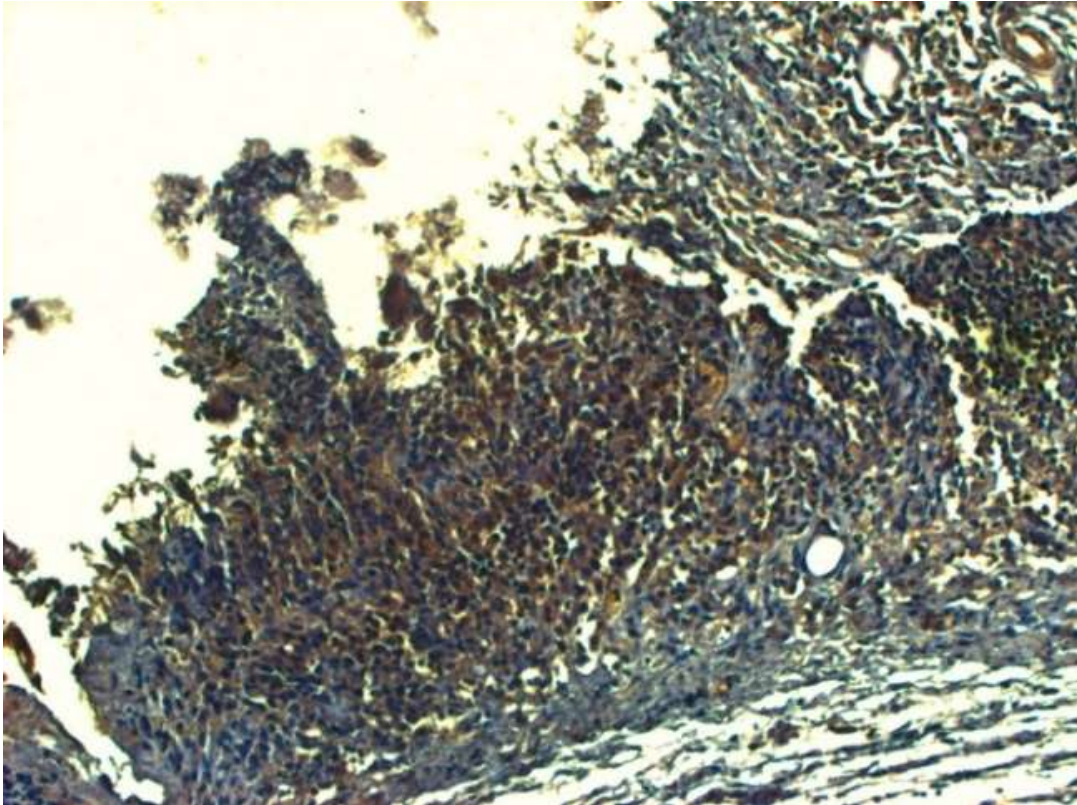
**Abb. 32: Tier 5, Stentbett, EvG, 10-fache Vergrößerung**

physiologische Aufbau des Endokrads mit deutlich erkennbaren und strukturiert verlaufenden elastischen Fasern (schwarz).

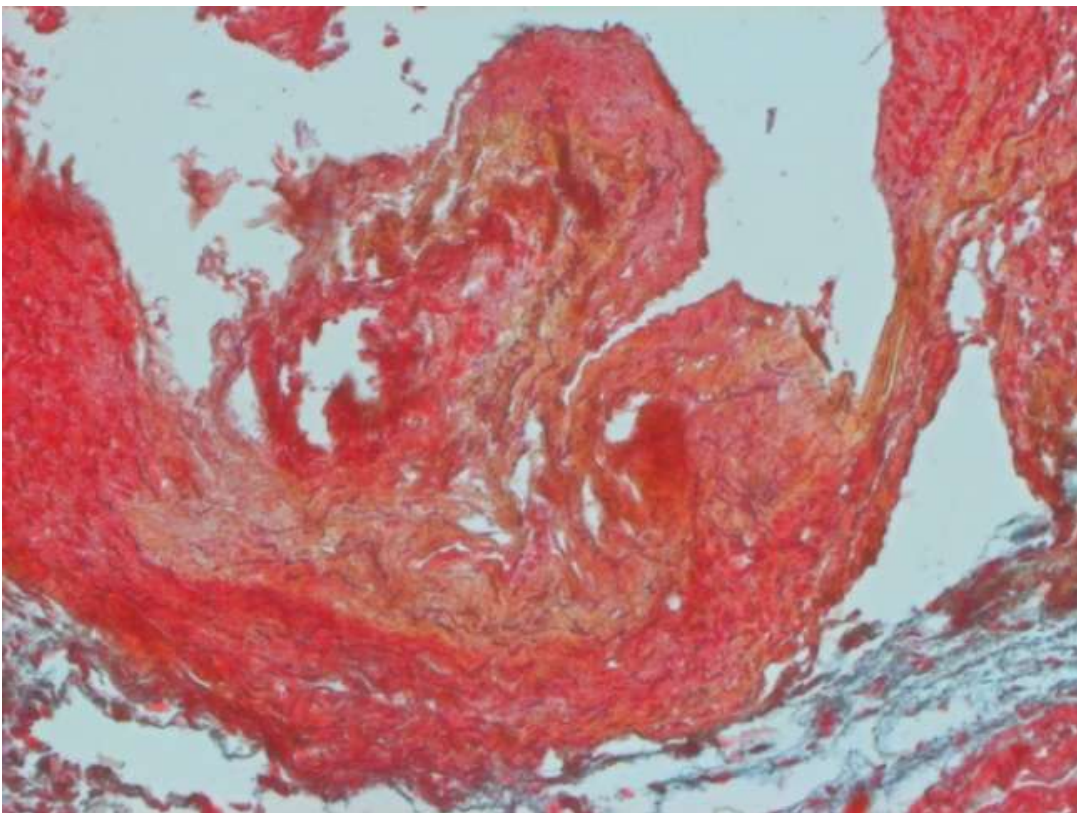


**Abb. 33: Tier 5, Atrium, HE, 10-fache Vergrößerung**

Gewebearchitektur ist stark gestört, massenhafte Ansammlung von Zellen ohne erkennbaren geordneten Verbund



**Abb. 34: Tier 5, Atrium, CD45, 20-fache Vergrößerung**  
Nachweis massenhafter Leukozyten (braun, Grad 2).



**Abb. 35: Tier 5, Atrium, MP, 20-fache Vergrößerung**  
Dort, wo es auch zur Ansammlung von Leukozyten gekommen war (vergleiche Abb. 34), lässt sich reichlich Fibrinbildung (helles rot) nachweisen.

### 3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Gewebearchitektur bei allen Tieren beeinträchtigt war. Jedoch gab es große Schwankungen bezüglich des Ausmaßes, sowohl in den einzelnen Tieren selbst als auch innerhalb der Gruppe. So ließen sich in jedem Tier Ausschnitte mit einem physiologischen Aufbau nachweisen, daneben jedoch immer auch solche Abschnitte, in denen die Integrität des Gewebes unterschiedlich stark beeinträchtigt war. Die Bildung von Fibrin ließ sich in unterschiedlichen Ausmaßen bei allen Tieren nachweisen, besonders ausgeprägt war diese bei Tier 1 und 5, hier ließ sich jeweils auch Kalk nachweisen.

Auch der Nachweis von Leukozyten war in der Versuchsgruppe sehr heterogen. Während bei Tier 1, 4 und 5 massenhaft anzufärben waren, ließen sich die CD45-positiven Zellen bei Tier 2 nur vereinzelt nachweisen, in den Schnitten des 3. Tieres kamen sie nur im Bereich des Atriums vor, und dort lokal geballt. CD3-positive Zellen ließen sich dagegen in allen Schnitten nicht oder nur sehr vereinzelt nachweisen.

B-Zellen war vor allem bei Tier 1 vermehrt darzustellen, auch in Tier 4 ließen sie sich zum Teil zahlreich nachweisen. Ansonsten waren CD20-positive Zellen nur vereinzelt nachzuweisen. Makrophagen kamen vor allem in Tier 1 und 5 vermehrt vor, sonst eher vereinzelt.

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Vergleichsgruppe wurden in Tabelle 6 und Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Zusammenfassung der Ergebnisse der histologischen Färbungen.

Pro Region und Färbung wurden jeweils 2 Schnitte analysiert. Die Einteilung der Ergebnisse der van-Kossa-Färbung erfolgte je nach Ausmaß der Verkalkung: Regional (r) Grad 0 (keine Verkalkung), 1 (vereinzelte Spots), 2 (konfluierende Verkalkung), 3 (flächige Verkalkung) und global (g) Grad 0 (keine Verkalkung), 1 (<10% der Schnittfläche), 2 (10%-50% der Schnittfläche) und 3 (>50% der Schnittfläche).

Tier	Schnitt	Hämatoxylin-Eosin	Movat-Pentachrome	Elastica-van-Gieson	Masson-Goldner	van Kossa
Tier 1	Stentbett	keine intakte Endothelschicht, unruhige Architektur, Hinweise auf Leukozyteninfiltration	Fibrin flächig, z.T. im Gewebe	Aufhebung der geordneten Gewebestruktur	unruhige Architektur im Stentbett	r2/g2
	Atrium	aufgelockertes Bindegewebe im Subendothel	Fibrin flächig	die elastischen Fasern im Subendothel verlaufen regelrecht parallel	sehr schwache Färbung	r1/g1
Tier 2	Stentbett	sehr hoher BiGew-Anteil, z.T sehr unregelmäßiger Faserverlauf	Fibrin	keine elastischen Fasern im Schnittbild	sehr schwache Färbung	r1/g1
	Atrium	regelmäßig wirkende Architektur	kein Fibrin	regelmäßig parallel verlaufende elastische Fasern im subendothelialen Bindegewebe	geordneter Faserverlauf im Bindegewebe	r0/g0
Tier 3	Stentbett	nur Myokard/ Epikard im Schnittbild, keine Auffälligkeiten	geringgradige Fibrineinlagerung im Epikard	nur Myokard/ Epikard im Schnittbild	nur Myokard/ Epikard im Schnittbild	r0/g0
	Atrium	regelmäßig wirkende Architektur		keine elastischen Fasern im Subendothel	regelmäßig wirkendes kollagenes Bindegewebe	r0/g0
Tier 4	Stentbett	Überwiegend sehr geordnet, zahlreiche Zellkerne	kein Fibrin	parallel verlaufende elastische Fasern im Subendothel	gleichmäßig verlaufendes kollagenes Bindegewebe	r0/g0
	Atrium	größtenteils vollständige Aufhebung einer geordneten Struktur	Fibrin	größtenteils vollständige Aufhebung einer geordneten Struktur. keine elastischen Fasern nachweisbar.	größtenteils vollständige Aufhebung einer geordneten Struktur	r0/g0
Tier 5	Stentbett	weitesgehend regelhafte Architektur. Areale mit unregelmäßigem Charakter	lokal isoliert	weitesgehend regelhafte Architektur. Areale mit unregelmäßigem Charakter	weitesgehend regelhafte Architektur. Areale mit unregelmäßigem Charakter	r0/g0
	Atrium	weitesgehend regelhafte Architektur. Areale (Schnitt 1 und 4) mit unregelmäßigem Charakter	flächig	weitesgehend regelhafte Architektur. Areale mit unregelmäßigem Charakter	weitesgehend regelhafte Architektur. Areale mit unregelmäßigem Charakter	r1/g1 (Klappe)

**Tabelle 7:** Übersicht über die Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen.

Pro Region und Färbung wurden jeweils zwei Schnitte angefertigt. Die Einteilung erfolgte nach Gradeinteilungen, dabei entspricht Grad 0 dem Nichtvorhandensein der anzufärbenden Zellen, Grad 1 steht für vereinzelt angefärbte Zellen, während Grad 2 bedeutet, dass viele Zellen im Präparat angefärbt wurden.

Tier	Schnitt	CD 45 (Leukozyten)		CD 3 (T-Zellen)		CD 20 (B-Zellen)		CD 68 (Makrophagen)	
Tier 1	Stentbett	2	2	0	0	2	2	1	2
	Atrium	2	2	1	1	2	2	2	2
		lokaler Fokus							
Tier 2	Stentbett	1	1	1	1	1	1	1	1
	Atrium	1	1	0	0	0	0	0	1
Tier 3	Stentbett	1	0	0	0	0	0	0	0
	Atrium	2	2	0	1	1	1	1	1
		lokaler Fokus							
Tier 4	Stentbett	2	2	1	0	1	2	1	1
	Atrium	2	2	1	1	1	2	0	1
Tier 5	Stentbett	1	2	0	0	0	1	1	2
	Atrium	2	1	0	1	0	1	1	1
Referenz		0	1	0	0	0	0	0	1

## 4 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass die Stent-gestützten Mitralklappen an vielen Stellen sehr gut eingewachsen sind und sich vielerorts die physiologische Struktur des angrenzenden Gewebes erhalten blieb.

Nichtsdestoweniger zeigten sich Anzeichen auf entzündliche Reaktionen. Das Vorkommen von Leukozyten im Gewebe ist nicht per se als pathologisch zu werten, sie sind Teil der Abwehr des Körpers und dienen als Wächter gegen potenziell schädigende Organismen oder Schädigungen. So fanden wir auch in dem gesunden Referenzschwein geringe Mengen an Leukozyten, größtenteils Makrophagen. Vor allem bei den Tieren 1, 4 und 5 konnten deutlich mehr Leukozyten nachgewiesen werden; bei diesen Tieren ließen sich nicht nur Makrophagen, sondern auch vermehrt B- und T-Zellen nachweisen, was die Vermutung nahe legt, dass es sich bei dem entzündlichen Geschehen bereits um eine spezifische Immunantwort handelte, der Körper sich mit dem Auslöser der Entzündungsreaktion demnach schon über eine geraume Zeit auseinandersetzt hatte.

Was genau der Auslöser für die Reaktionen im Gewebe ist, wird in dieser Arbeit nicht abschließend festgestellt werden können, denn wie in der Einleitung beschrieben, ist die Immunantwort eines Körpers sehr unspezifisch. Die Reaktionen auf sehr unterschiedliche Einflüsse sind in der Regel sehr ähnlich.

Im Folgenden sollen unterschiedliche Ursachen diskutiert werden, die als Auslöser in Frage kommen.

### 4.1 Korrosion

Metallimplantate, wie zum Beispiel auch Koronarstents, unterliegen u.a. durch mechanischen Stress Abnutzung und Korrosion, dadurch kommt es zur Auflösung des Metalls und Freisetzen der Metall-Ionen in das umliegende Gewebe. Es wurde gezeigt, dass die Freisetzung von Metallionen bei Stents aus Nickel und Titan-Legierungen besonders hoch ist [14]. Metallionen wiederum haben in den Versuchen zu Entzündungsreaktionen im betroffenen Gewebe geführt, charakterisiert vor allem durch das Auftreten von Makrophagen [15] [16]. Die von der Arbeitsgruppe eingebrachten Nitinol-Stents unterliegen hohen mechanischen Beanspruchun-

gen, es ist somit möglich, dass das Auftreten der Entzündungsreaktionen auf eine Korrosion den Stents zurückzuführen ist.

## 4.2 Fremdkörperreaktion

Mit dem Stent wurde körperfremdes Material in den Körper der Schweine eingebracht. Daraufhin reagiert das Immunsystem mit einer Fremdkörperreaktion (foreign body reaction, FBR). Diese weist sehr viele Ähnlichkeiten mit der Wundheilung auf, jedoch steht am Ende der FBR die Ausbildung einer bindegewebigen Kapsel um den Fremdkörper herum [17]. Die genauen Auslöser der FBR sind unklar, es kommen mehrere Aspekte in Frage: So scheinen mechanische Belastungen der eingebrachten Fremdkörper die Entzündungskaskade triggern zu können [18], aber auch die bei der Implantation ins Gewebe verursachten Zellschäden scheinen eine Rolle zu spielen [19]. Es ist bei dem Einbringen des Stents in den Mitralanulus auf Grund des minimalinvasiven Vorgehens nur mit minimalen Gewebeverletzungen zu rechnen, allerdings muss gleichzeitig von hohen Scherkräften an der Grenze zwischen dem Stent und dem umgebenden Gewebe ausgegangen werden. Auch das eingebrachte Material hat einen Einfluss auf die Reaktion des Körpers, so scheinen Implantate eine deutlich geringere Fremdkörperreaktion hervorzurufen, je größer sie sind [20], damit wäre bei den vergleichsweise großen Implantaten nur eine sehr geringe FBR zu erwarten. Allerdings gibt es Arbeiten, die Titan[21] und Nickel [22] als möglichen Trigger der FBR betrachten. Es ist folglich nicht auszuschließen, dass durch das Einbringen der Stents in die Schweine eine Fremdkörperreaktion ausgelöst wurde.

Eine Fremdkörperreaktion wird in fünf Phasen eingeteilt [23]. Die erste Phase ist gekennzeichnet durch die Anlagerung von zirkulierenden Proteinen, hier vor allem Fibrinogen, an das körperfremde Material und die Bildung einer provisorischen Matrix, welche die Chemotaxis von Entzündungszellen wie Makrophagen verstärken [24]. Diese Phase dauert nur wenige Sekunden bis Minuten und wird gefolgt von einer Phase der akuten Entzündung. Diese, einige Stunden bis wenige Tage andauernde Reaktion ist charakterisiert durch das Auftreten von Granulozyten und Mastzellen. Da diese beiden Phasen der FBR nur wenige Tage andauern, können sie kaum der Grund für das in den histologischen Schnitten beobachtete Auftreten von Fibrin und Entzündungszellen verantwortlich sein, da die Implantation des Fremdkörpers zum Zeitpunkt der Analyse mindestens vier Wochen her war. Die dritte Phase der FBR wird als chronische Entzündung beschrieben und mit einem Zeitraum von zwei bis fünf Wochen nach



der Implantation definiert. Drei der Tiere fallen mit einem Überleben von vier bis fünf Wochen in diesen Zeitraum. Die Phase der chronischen Entzündung ist charakterisiert durch das Auftreten von Lymphozyten und Makrophagen. Tatsächlich sind bei den Tieren 1 und 2, jeweils mit einem Überleben von vier Wochen, vermehrt Makrophagen nachzuweisen, daneben kommen aber vor allem bei Tier Nummer 1 viele B-Zellen im Gewebe vor, was für eine FBR eher untypisch ist, da hier eher mit dem vermehrten Auftreten von T-Lymphozyten zu rechnen wäre [25]. Bei Tier Nummer 3 (Überleben: fünf Wochen) sind insgesamt eher weniger Leukozyten nachzuweisen, somit ist bei diesem Tier nicht vom Vorliegen einer FBR auszugehen. Bis zu diesem Zeitpunkt weist die FBR viele gemeinsame Aspekte mit der Wundheilung auf. Im weiteren Verlauf aber kommt es in der vierten Phase zur Ausbildung von Fremdkörper-Riesenzellen, einem Zusammenschluss vieler Makrophagen, anscheinend mit dem Ziel, entweder nach frustraner Phagozytose als Individuum der Apoptose zu entgehen oder um als Verbund effektiver zu sein [26]. Die letzte, fünfte Phase der FBR zeigt die Ausbildung einer fibrösen, kollagenreichen Kapsel um den Fremdkörper herum, Entzündungszellen kommen hier kaum noch vor. Bei Tier Nummer 4 lassen sich in Bereichen des Atriums Areale nachweisen, bei denen es zu einem vermehrten bindegewebigen Umbau gekommen ist, in dem sich kein Fibrin und, zumindest in diesen spezifischen Arealen, auch nur wenige Immunzellen nachweisen lassen. Dies könnte Ausdruck einer abgelaufenen FBR sein. Bei Tier Nummer 5 spricht das nach 12 Wochen nach Implantation noch flächige Vorhandensein von Fibrin sowie die vermehrte Präsenz von Leukozyten gegen das Vorhandensein einer FBR.

### **4.3 Endokarditis**

Entzündungen des Endokards und der Herzklappen (Endokarditis) können unterschiedliche Ursachen haben. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen der infektiösen und der nicht-infektiösen Endokarditis (z.B. als Komplikation des rheumatischen Fiebers), wobei die infektiöse Endokarditis deutlich häufiger auftritt. Dabei handelt es sich um eine Infektion von primär nichtbakteriellen thrombotischen Vegetationen. Diese erfolgt durch Bakteriämien, welche auch nur von kurzer Dauer sein können [27]. Als Träger eines Klappenersatzes gehören die Tiere per se einer Risikogruppe an [28], wobei bei den Versuchstieren weitere Risikofaktoren, wie zum Beispiel hohes Alter, Hämodialyse oder eine Immunsuppression [29] nicht vorlagen. Den Tieren wurden perioperativ ein arterieller und ein zentralvenöser Zugang geschaffen.

Auch Katheterinfektionen können ein Ausgangspunkt für Endokarditiden sein, allerdings war bei den Versuchstieren die Verweildauer der Katheter mit wenigen Stunden sehr kurz, was gegen die Katheter als Ursache einer Endokarditis spricht [30]. Des Weiteren wären dann eher Läsionen des rechten Herzen zu erwarten [31].

Die Symptome einer Endokarditis sind sehr unspezifisch, jedoch lassen sich im klinischen Verlauf bei allen Tieren Symptome finden, die auf eine Endokarditis zurückzuführen wären [32]: Tier 1 zeigte sich appetitlos und bei gemindertem Allgemeinzustand, bei Nummer 2, 3 und 5 trat ein neues Herzgeräusch auf, welches bei Tier Nummer 2 von einem Perikarderguss begleitet wurde, bei Tier 4 könnte die Wesensveränderung Ausdruck einer zerebralen Ischämie sein, die durch eine Embolie ausgelöst wurde. Auch in den postmortalen Untersuchungen zeigten bis auf Tier 3 alle Tiere unterschiedlich stark ausgeprägte makroskopische Hinweise auf eine Endokarditis, wie Fibrinauflagerungen oder Thrombenbildung an den Klappensegeln. In Autopsien von Menschen konnte gezeigt werden, dass prothesen-assoziierte Endokarditiden (PVE, prostetic valve endocarditis) häufig auf angrenzendes Herzgewebe übergreift und auch abseits der Herzklappen entzündliche Reaktionen wie intramurale Abszesse und Vegetationen hervorrufen [33]. Histomorphologisch ist die infektiöse Endokarditis durch das Auftreten bakteriell besiedelter Thromben mit vielen neutrophilen segmentkernigen Granulozyten gekennzeichnet [27]. In den von uns durchgeführten Untersuchungen erfolgte kein spezifischer Nachweis von möglichen Erregern, z.B. durch Blutkulturen. Auch Granulozyten wurden nicht spezifisch angefärbt.

Bei Betrachtung der klinischen Verläufe und der makroskopischen Befunde ist die Diagnose einer infektiösen Endokarditis naheliegend.

#### **4.4 Kalk**

Bei drei der Tiere ließ sich in den histologischen Untersuchungen Kalk im Gewebe nachweisen. Für die Ursache dieser Kalkbildung sind unterschiedliche Begründungen denkbar:

Zum einen ist der Stent in dem Mitralanulus größer, kontinuierlicher Belastung ausgesetzt, woraus auch der Stentbruch bei Tier 5 resultieren kann. Mechanischer Stress wiederum fördert die Bildung von Kalk im Gewebe [34].

Betrachtet man die Verkalkungen in den betroffenen Versuchstieren, so fällt auf, dass die Verkalkung vor allem in Regionen auftritt, in denen es auch zu einer vermehrten Fibrinbildung gekommen ist. Das Fibrin selbst die Bildung von Kalk zu induzieren scheint, ist auch das Ergebnis erster in-vitro Versuche [35].

Bei zwei der drei Tiere, in denen Kalkbildung nachgewiesen wurde, ist der Kalk im Bereich des Mitalanulus am stärksten ausgeprägt bzw. kommt nur dort vor. Damit könnten diese Befunde auch als beginnende Mitralanulusverkalkung (MAC) gewertet werden, welche häufig als eine fortschreitende degenerative Erkrankung eingeordnet wird. Sie wird aber auch durch veränderte Scherkräfte und Druckgradienten über der Klappenebene begünstigt [36], wie es bei einem stattgehabten chirurgischem Klappenersatz der Fall ist. Die Diagnostik und Einschätzung einer MAC erfolgt in den Studien in der Regel entweder echokardiographisch [37], [38] oder radiologisch (Computertomographie (CT) [39] bzw. Cardio-CT [40]). In den Untersuchungen der Tiere in der hiesigen Arbeitsgruppe wurde zwar nicht spezifisch auf eine MAC geachtet, jedoch sind in den TEE- und CT-Untersuchungen keine derartigen Befunde beschrieben, die auf eine höhergradige Verkalkung des Mitralanulus hinweisen würden. Auch die postmortale Untersuchung der Scheine ergab keine makroskopischen oder palpatorischen Hinweise auf eine Verkalkung des Mitralanulus. Es kann sich bei den mikroskopischen Befunden also allenfalls um ein sehr frühes, beginnendes Stadium einer MAC handeln.

Mehrere Studien legen nahe, dass die Verkalkung des Mitralanulus und stenotische Herzklappenerkrankungen ein Ausdruck arteriosklerotischer Prozesse sind [39],[37],[41] und somit Ausdruck eines allgemein erhöhten kardiovaskulären Risikos [38].

Es besteht eine enge Interaktion zwischen den Enzymen der Gerinnungskaskade und entzündlichen Prozessen. So verstärken beispielsweise Thrombin und Fibrin sowie dessen Spaltprodukte die Chemotaxis von Monozyten [42],[43],[44]. Es konnte bei allen Tieren Fibrinbildung in unterschiedlichem Ausmaß nachgewiesen werden. Fibrin ist das Endprodukt der Gerinnungskaskade, darüber hinaus spielt es aber auch bei Bildung und Wachstum von arteriosklerotischen Plaques eine entscheidende Rolle und ist als Ausdruck eines anhaltenden Gewebeschadens zu werten. Durch verschiedene biochemische Mediatoren, wie zum Beispiel auch bei Entzündungsprozessen oder auch durch Scherkräfte, kommt es zu einer Umwandlung von

valvulären intestitiellen Zellen zu osteoblastischen Zellen. Dabei ist der Ausgang der Verkalkung immer eine Endothelläsion [45]. Es ist davon auszugehen, dass durch das Einbringen der Stents immer zu Mikroläsionen am angrenzenden Gewebe kommt und damit die Ausgangsvoraussetzung für Verkalkungen geschaffen wird.

Das parallele Auftreten von Entzündungszellen, Fibrin und Verkalkungen kann demnach als Ausdruck beginnender arteriosklerotischer Prozesse gewertet werden.

#### **4.5 Zusammenfassung der Diskussion**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die im Gewebe aufgetretenen Auffälligkeiten, die auf eine Entzündungsreaktion hinweisen, nicht abschließend auf eine spezifische Ursache zurückführen lassen. Eine infektiöse Endokarditis scheint vor allem bei den Tieren wahrscheinlich, die zuvor auch dahingehende klinische Symptome gezeigt haben. Ansonsten kommt aber auch mechanische Beanspruchung des Gewebes ähnlich wie die Korrosion des verwendeten Materials als Ursache für Entzündungsreaktionen oder Verkalkungen in Frage. Betrachtet man das gemeinsame Auftreten von Fibrin, Entzündungszellen und Verkalkungen, so liegt der Vergleich mit arteriosklerotischen Prozessen nahe. Ebenfalls ist es denkbar, dass mehrere Aspekte nebeneinander auftreten und sich gegebenenfalls gegenseitig begünstigen. Wie schon eingangs bemerkt, sind die immunologischen Reaktionen des Körpers auf sehr unterschiedliche Reize jeweils sehr ähnlich. Um diese genau auseinander halten zu können, wären weitere, sehr viel spezifischere Untersuchungen nötig.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Stents über weite Strecken gut eingewachsen sind. Das Auftreten von Entzündungszellen und das Vorhandensein von geringgradigen, im Gewebe nur mikroskopisch nachzuweisenden Verkalkungen, ist als potenzielles Problem zu betrachten. Allerdings ist die physiologische Architektur des den Stent umgebenden Gewebes häufig erhalten geblieben, was als ermutigende Ergebnisse zu sehen ist.

Eine abschließende vergleichende Analyse der unterschiedlichen Stent-Typen (mit und ohne Haken) ist durch die geringe Anzahl der Vergleichstiere schwierig. Lediglich einem Tier in der Gruppe war der Stent mit drei Haken implantiert worden. In den histologischen Auswertungen hatten sich dort teils ausgeprägtere Hinweise auf eine entzündliche Veränderung des Gewebes ergeben. In wie weit diese Veränderungen auf das Vorhandensein der Haken zurückzuführen ist, kann hier nicht abschließend beurteilt werden.

## 5 Zusammenfassung

Durch die Arbeitsgruppe wurden klappentragende Stents in 34 Schweine implantiert. Davon überlebten fünf der Tiere vier Wochen oder länger. Diese Tiere wurden für diese Arbeit näher betrachtet. Dafür wurden postmortal Gewebeproben aus dem Herzen jeweils am Stentbett sowie am atrialen Übergang entnommen und im Anschluss histologisch und immunhistochemisch (Leukozyten (CD45), T-Zellen (CD3), B-Zellen (CD20) und Makrophagen (CD68)) aufgearbeitet und analysiert. Bei den implantierten Stents handelte es sich um selbstexpandierende, mit einer Polytetrafluoroethylene (PTFE)-Membran bezogene Nitinol-Stents, bei einem Tier waren zur Fixierung im Gewebe drei Haken am Stent angebracht. Für die Klappen wurde porkines Perikardgewebe verwendet.

In der Auswertung ließen sich bei jedem Tier Areale mit physiologischer Gewebearchitektur nachweisen. Allerdings zeigten sich auch Hinweise auf entzündliche Veränderungen des Gewebes. In allen Tieren ließ sich Fibrin in unterschiedlichem Ausmaß nachweisen. Kalk wurde bei zwei Tieren in hohem, bei zwei anderen in deutlich geringerem Ausmaß nachgewiesen. Leukozyten kamen bei drei Tieren in großem Ausmaß vor, ansonsten kamen so kaum oder nur lokal begrenzt vor. Auch Makrophagen waren in jedem Tier nachzuweisen, bei zwei Tieren kamen sie in großer Anzahl vor, ansonsten traten sie nur sporadisch auf. T-Zellen kamen nur vereinzelt vor. B-Zellen traten bei zwei Tieren vermehrt auf, ansonsten ließen auch diese sich nur vereinzelt nachweisen. Ein genereller Unterschied zwischen den Proben aus dem Stentbett oder den atrialen Anteilen fiel nicht auf. In den Proben um den hakenbesetzten Stent zeigten sich tendenziell stärker ausgeprägte Entzündungszeichen. Eine abschließende vergleichende Beurteilung ist bei nur einem betroffenen Tier aber ohne Kontrolle kaum möglich.

Die Veränderungen lassen sich teilweise im Rahmen physiologischer Heilungsprozesse erklären. Es könnte sich aber auch um eine Fremdkörperreaktion handeln, eine Reaktion auf eine eventuell stattfindende Korrosion des Stents oder Ausdruck einer Endokarditis sein. Die Reaktionen des Organismus auf diese sehr unterschiedlichen Reize sind sehr unspezifisch und ähnlich, zur genauen Unterscheidung sind detailliertere, spezifischere Untersuchungen notwendig. Zusammenfassend konnte eine streckenweise gute Integration des Nitinol-Stents in sein umliegendes Gewebe gezeigt werden. Allerdings zeigen Entzündungsreaktionen und die Bildung von Kalk potenzielle Risikofaktoren auf, die weiter untersucht werden müssen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Lüllmann-Rauch, Renate (2009): Taschenlehrbuch Histologie. 3. Aufl. Georg Thieme Verlag
- [2] Pape, Hans-Christian; Klinke, Rainer; Brenner, Bernhard; Silbernagl, Stefan (2014): Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. Georg Thieme Verlag KG. s.l.
- [3] Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn (2018): Krankenhausstatistik. Diagnosedaten zu Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern
- [4] United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2017): World Population Prospects: The 2017 Revision, Volume II: Demographic Profiles.
- [5] Baumgartner, H.; Falk, V.; Bax, J. J.; Bonis, M. de; Hamm, C.; Holm, P. J.; Jung, B.; Lancellotti, P.; Lansac, E.; Rodriguez Muñoz, D.; Rosenhek, R.; Sjögren, J.; Tornos Mas, P.; Vahanian, A.; Walther, T.; Wendler, O.; Windecker, S.; Zamorano, J. L. (2017): 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *European heart journal*, 36, 2739–2791
- [6] Passaroni, Andréia Cristina; Silva, Marcos Augusto de Moraes; Yoshida, Winston Bonetti (2015): Cardiopulmonary bypass. Development of John Gibbon's heart-lung machine. *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular : orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 2, 235–245
- [7] Mehta, R. H.; Eagle, K. A.; Coombs, L. P.; Peterson, E. D.; Edwards, F. H.; Pagani, F. D.; Deeb, G. M.; Bolling, S. F.; Prager, R. L. (2002): Influence of age on outcomes in patients undergoing mitral valve replacement. *The Annals of Thoracic Surgery*, 5, 1459–1467
- [8] Leon, Martin B.; Smith, Craig R.; Mack, Michael; Miller, D. Craig; Moses, J. W.; Svensson, L. G.; Tuzcu, E. M.; Webb, J. G.; Fontana, G. P.; Makkar, R. R.; Brown, D. L.; Block, P. C.; Guyton, R. A.; Pichard, A. D.; Bavaria, J. E.; Herrmann, H. C.; Douglas, P. S.; Petersen, J. L.; Akin, J. J.; Anderson, W. N.; Wang, D.; Pocock, S. (2010): Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *The New England journal of medicine*, 17, 1597–1607
- [9] (2012): June 24.2012 news release: CardiAQ Valve Technologies reports cardiovascular medicine milestone: first-in-human nonsurgical percutaneous implantation of a bioprosthetic mitral heart valve. June 24.2012 news release: CardiAQ Valve Technologies reports cardiovascular medicine milestone: first-in-human nonsurgical percutaneous implantation of a bioprosthetic mitral heart valve.
- [10] Attmann, Tim; Pokorny, Saskia; Lozonschi, Lucian; Metzner, Anja; Marcynski-Bühlow, Martin; Schoettler, Jan; Cremer, Jochen; Lutter, Georg (2011): Mitral valved stent implantation. An overview. *Minimally invasive therapy & allied technologies : MITAT : official journal of the Society for Minimally Invasive Therapy*, 2, 78–84

- [11] Pokorny, S.; Heinig, A.; Hettich, H.; Bähr, T.; Marczynski-Bühlow, M.; Morlock, M. M.; Sattler, B.; Schöttler, J.; Lutter, G. (2015): Transapical Mitral Valved Stent Implantation. Computed Tomographic Evaluation Of Different Prototype Designs. *EuroIntervention*, 8, 948–955
- [12] Pokorny, S.; Huenges, K.; Bähr, T.; Hansen, J. H.; Fischer, G.; Gross, J.; Morlock, M. M.; Cremer J.; Lutter G. (2014): Transapical mitral valved stent implantation. Enhanced survival and decreased paravalvular leakages. *International journal of cardiology*, 3, 418–424
- [13] Lutter G.; Pokorny S.; Frank D.; Cremer J.; Lozonschi L. (2013): Transapical mitral valve implantation: the Lutter valve. *Heart, Lung and Vessels*, 5(4), 201–206
- [14] Halwani, D. O.; Anderson, P. G.; Lemons, J. E.; Jordan, W. D.; Anayiotos, A. S.; Brott, B. C. (2010): In-vivo corrosion and local release of metallic ions from vascular stents into surrounding tissue. *The Journal of invasive cardiology*, 11, 528–535
- [15] Kapnisis, K. K.; Pitsillides, C. M.; Prokopi, M. S.; Lapathitis, G.; Karaiskos, C.; Eleftheriou, P. C.; Brott, B. C.; Anderson, P. G.; Lemons, J. E.; Anayiotos, A. S. (2016): In vivo monitoring of the inflammatory response in a stented mouse aorta model. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 1, 227–238
- [16] Voggenreiter, G.; Leiting, S.; Brauer, H.; Leiting, P.; Majetschak, M.; Bardenheuer, M.; Obertacke, U. (2003): Immuno-inflammatory tissue reaction to stainless-steel and titanium plates used for internal fixation of long bones. *Biomaterials*, 2, 247–254
- [17] Sheikh, Z.; Brooks, P. J.; Barzilay, O.; Fine, N.; Glogauer, M. (2015): Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. *Materials (Basel, Switzerland)*, 9, 5671–5701
- [18] Bao, X.; Lu, C.; Frangos, J. A. (1999): Temporal Gradient In Shear But Not Steady Shear Stress Induces PDGF-A And MCP-1 Expression In Endothelial Cells. Role Of NO, NF Kappa B, And Egr-1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 4, 996–1003
- [19] Kono, H.; Rock, K. L. (2008): How Dying Cells Alert The Immune System To Danger. *Nature reviews. Immunology*, 4, 279–289
- [20] Veisoh, Omid; Doloff, Joshua C.; Ma, Minglin; Vegas, Arturo J.; Tam, Hok Hei; Bader, A. R.; Li, J.; Langan, E.; Wyckoff, J.; Loo, W. S.; Jhunhunwala, S.; Chiu, A.; Siebert, S.; Tang, K.; Hollister-Lock, J.; Aresta-Dasilva, S.; Bochenek, M.; Mendoza-Elias, J.; Wang, Y.; Qi, M.; Lavin, D. M.; Chen, M.; Dholakia, N.; Thakrar, R.; Lacík, I.; Weir, G. C.; Oberholzer, J.; Greiner, D. L.; Langer, R.; Anderson, D. G. (2015): Size- And Shape-Dependent Foreign Body Immune Response To Materials Implanted In Rodents And Non-Human Primates. *Nature materials*, 6, 643–651
- [21] Fernandes, K. R.; Zhang, Y.; Magri, A. M. P.; Renno, A. C. M.; van den Beucken, J. J. P. (2017): Biomaterial Property Effects on Platelets and Macrophages. An in Vitro Study. *ACS biomaterials science & engineering*, 12, 3318–3327

- [22] Shotar, E.; Law-Ye, B.; Baronnet-Chauvet, F.; Zeidan, S.; Psimaras, D.; Bielle, F.; Pecquet, C.; Navarro, S.; Rosso, C.; Cohen, F.; Chiras, J.; Di Maria, F.; Sourour, N.; Clarençon, F. (2016): Non-Ischemic Cerebral Enhancing Lesions Secondary To Endovascular Aneurysm Therapy. Nickel Allergy Or Foreign Body Reaction? Case Series And Review Of The Literature. *Neuroradiology*, 9, 877–885
- [23] Klopffleisch, R.; Jung, F. (2017): The Pathology Of The Foreign Body Reaction Against Biomaterials. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 3, 927–940
- [24] Anderson, James M.; McNally, Amy K. (2011): Biocompatibility Of Implants. Lymphocyte/Macrophage Interactions. *Seminars in immunopathology*, 3, 221–233
- [25] Brodbeck, W. G.; Macewan, M.; Colton, E.; Meyerson, H.; Anderson, J. M. (2005): Lymphocytes And The Foreign Body Response. Lymphocyte Enhancement Of Macrophage Adhesion And Fusion. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2, 222–229
- [26] Brodbeck, W. G.; Shive, M. S.; Colton, E.; Nakayama, Y.; Matsuda, T.; Anderson, J. M. (2001): Influence Of Biomaterial Surface Chemistry On The Apoptosis Of Adherent Cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 4, 661–668
- [27] Böcker, W.; Denk, H.; Heitz, P. U. (2004): *Pathologie*. 3. Auflage. Elsevier. München
- [28] Hill, E. E.; Herijgers, P.; Herregods, M-C.; Peetermans, W. E. (2006): Evolving trends in infective endocarditis. *Clinical Microbiology and Infection*, 1, 5–12
- [29] Mostaghim, A. S.; Lo, H.Y.A.; Khardori, N. (2017): A Retrospective Epidemiologic Study To Define Risk Factors, Microbiology, And Clinical Outcomes Of Infective Endocarditis In A Large Tertiary-Care Teaching Hospital. *SAGE Open Medicine*, 3, 205031211774177
- [30] Safdar, Nasia; Kluger, Daniel M.; Maki, Dennis G. (2002): A review of risk factors for catheter-related bloodstream infection caused by percutaneously inserted, noncuffed central venous catheters. Implications for preventive strategies. *Medicine*, 6, 466–479
- [31] Ducatman, B. S.; McMichan, J. C.; Edwards, W. D. (1985): Catheter-Induced Lesions Of The Right Side Of The Heart. A One-Year Prospective Study Of 141 Autopsies. *JAMA*, 6, 791–795
- [32] [Der Titel "Seybold, Suttorp 2016 – Klinisches Bild der infektiösen Endokarditis" kann nicht dargestellt werden. Die Vorlage "Literaturverzeichnis - Beitrag im Sammelwerk - (Standardvorlage)" enthält keine Informationen.]
- [33] Fernández Guerrero, M. L.; Álvarez, B.; Manzarbeitia, F.; Renedo, G. (2012): Infective Endocarditis At Autopsy. A Review Of Pathologic Manifestations And Clinical Correlates. *Medicine*, 3, 152–164
- [34] Whalen, R. L.; Snow, J. L.; Harasaki, H.; Nosé, Y. (1980): Mechanical Strain And Calcification in Blood Pumps. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, XXVI, 487–492
- [35] Koutsopoulos, S.; Dalas, E. (2000): The Calcification Of Fibrin In Vitro. *Journal of Crystal Growth*, 1-4, 450–458



- [36] Abramowitz, Y.; Jilaihawi, H.; Chakravarty, T.; Mack, M. J.; Makkar, R. R. (2015): Mitral Annulus Calcification. *Journal of the American College of Cardiology*, 17, 1934–1941
- [37] Adler, Y.; Fink, N.; Spector, D.; Wiser, I.; Sagie, A. (2001): Mitral Annulus Calcification — A Window To Diffuse Atherosclerosis Of The Vascular System. *Atherosclerosis*, 1, 1–8
- [38] Barasch, E.; Gottdiener, J. S.; Larsen, Emily K. M.; Chaves, P. H. M.; Newman, A. B.; Manolio, T. A. (2006): Clinical Significance Of Calcification Of The Fibrous Skeleton Of The Heart And Aortosclerosis In Community Dwelling Elderly. The Cardiovascular Health Study (CHS). *American heart journal*, 1, 39–47
- [39] Allison, Matthew A.; Cheung, Philip; Criqui, Michael H.; Langer, Robert D.; Wright, C. Michael (2006): Mitral and aortic annular calcification are highly associated with systemic calcified atherosclerosis. *Circulation*, 6, 861–866
- [40] Higgins, Jennifer; Mayo, John; Skarsgard, Peter (2013): Cardiac computed tomography facilitates operative planning in patients with mitral calcification. *The Annals of Thoracic Surgery*, 1, e9-11
- [41] Natorska, Joanna; Marek, Grzegorz; Hlawaty, Marta; Sobczyk, Dorota; Sadowski, Jerzy; Tracz, Wiesława; Undas, Anetta (2009): Evidence for tissue factor expression in aortic valves in patients with aortic stenosis. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 10, 636–643
- [42] Loeffen, R.; Spronk, H. M. H.; Cate, H. ten (2012): The impact of blood coagulability on atherosclerosis and cardiovascular disease. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 7, 1207–1216
- [43] Hsieh, Jessica Y.; Smith, Tim D.; Meli, Vijaykumar S.; Tran, Thi N.; Botvinick, Elliot L.; Liu, Wendy F. (2017): Differential regulation of macrophage inflammatory activation by fibrin and fibrinogen. *Acta biomaterialia*, 14–24
- [44] Szaba, F. M.; Smiley, S. T. (2002): Roles for Thrombin And Fibrin(ogen) In Cytokine/Chemokine Production And Macrophage Adhesion In Vivo. *Blood*, 3, 1053–1059
- [45] Natorska, J.; Undas, A. (2015): Blood Coagulation And Fibrinolysis In Aortic Valve Stenosis. Links With Inflammation And Calcification. *Thrombosis and haemostasis*, 2, 217–227

## 7 Anhänge

### Abstract

#### Objective

The aim of this study was the histological evaluation of mitral valved stents in an experimental in vivo porcine model four to 12 weeks after implantation with a focus on inflammatory reactions.

#### Methods

The self-expanding mitral valved stents were implanted in healthy porcine models via trans-apical approach in the beating heart. In this study, a histological evaluation of five animals is presented. The stents were implanted in vivo for a period of four weeks or longer. Posthumously, samples of the native mitral annulus and the atrial stent's bed were taken and histologically analyzed (H&E, Masson's trichrome, Elastica van Gieson, Movat's Pentachrome and von Kossa). Furthermore, leukocytes, B-cells, T-cells and macrophages were detected by specific immunohistochemically staining (CD45, CD3, CD20, CD68).

#### Results

The tissue's architecture showed largely physiological regular structure, but also presented local areas in which the integrity of the tissue was damaged to different extents. In all animals the formation of fibrin was detected to different extents. In all but one animal partly mild (n=2) or no (n=2) accumulations of calcium carbonate were shown.

Some inflammation in the surrounding tissue was detectable. In three of five animals a strong, in one animal a locally restricted and in one animal only a sporadic presence of CD45+ leukocytes were found. A moderate (n=4) or strong (n=1) distribution of CD68+ macrophages was detectable. Only low numbers of CD3+ T cells and CD20+ B cells were found in all animals but one. These results indicate an innate immune response but only low adaptive immune response after up to 12 weeks post-implantation. No differences between annulus and the atrial stent's bed were visible.

**Discussion**

The histological evaluation of five mitral valved stents showed widely a good integration into the native heart's tissue. The stent surrounding tissue was classified and characterized for the first time. However, signs for inflammation and slight presence of calcification show potential risks. This has to be evaluated in more detail in a future study including a larger number of cases.

## **Veröffentlichungen**

Poster, 16. ISMICS Annual Scientific Meeting, 15.-18. Juni 2016

Poster, EuroPCR 2016, 17.-20.05.2016

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Lutter für das Überlassen des Themas sowie Frau Dr. Anja Metzner für die Betreuung während der Arbeit an der Promotion.

Herzlichen Dank an Frau Dr. Jessica Haupt, Frau Beke Sarrahs und Frau Birgit Pieper für die Unterstützung bei den Arbeiten im Labor.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und Kameraden, die mich immer wieder motiviert und meinen Fokus auf das Wesentliche gerichtet haben.