

Aus dem
Institut für Herzchirurgie des Klinikums Großhadern
der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand Prof. Dr. med. B. Reichart
und aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der
Technischen Universität München
Direktor Prof. Dr. med. B. Gänsbacher

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. med. S. Däbritz

Vorgelegt über das
Institut für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. W. Schmahl

**Heterotope Implantation von porzinen Aortenklappen mit wirtsautologer
Endothelzellbeschichtung im Schafmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Korbinian Christoph Pieper
aus
Wiesbaden

München, 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Koreferentin: Univ.-Prof. Dr. E. Kienzle

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum.....	3
2.1	Biologische Aortenklappenprothesen beim Menschen	3
2.2	Tiermodelle für Klappenprothesen.....	4
2.2.1	Problematik der Transplantation in orthotoper Position.....	6
2.3	Gründe für die Verkalkung von Glutaraldehyd-fixierten Herzklappenprothesen.....	8
2.3.1	Gegenmaßnahmen zur Mineralisation	11
2.4	Tissue Engineering von Herzklappen und damit verbundene Probleme	14
2.5	Toxizitätsreduktion von Glutaraldehyd	19
2.6	Nachweis von Endothelzellaktivität	20
2.7	Die „Freestyle“-Aortenklappe.....	20
3	Eigene Untersuchungen	21
3.1	Zielvorstellungen.....	21
3.2	Material und Methodik	22
3.2.1	Klappenprothesen	22
3.2.2	Versuchstiere	23
3.2.3	Versuchsplan	23
3.2.4	Versuchsdurchführung.....	25
3.2.4.1	Anästhesie	25
3.2.4.2	Entnahme eines Teilstücks der Vena jugularis	26
3.2.4.3	Aufbereitung der Venenstücke und Beschichtung der porzinen Aortenklappen	26
3.2.4.4	Thorakaler Eingriff.....	28
3.2.5	Monitoring	30
3.2.5.1	Lungenfunktion	30
3.2.5.2	Hämodynamisches Monitoring	31
3.2.5.3	Organdurchblutung durch den Shunt.....	32
3.2.5.4	Echokardiographie der Klappen.....	32
3.2.6	Postoperative Überwachung.....	32
3.2.7	Explantation der Klappen; Euthanasie der Tiere.....	33
3.2.8	Makroskopische Untersuchung der Klappen	33
3.2.9	Aufbereitung der histologischen Präparate	34
3.2.9.1	Immunhistochemie	34
3.2.9.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	34
3.2.9.3	Fluoreszenzmikroskopie	35
3.2.10	Statistische Auswertung.....	35
3.3	Ergebnisse	36
3.3.1	Klinische Erscheinungen	36
3.3.2	Ergebnisse des Narkosemonitorings.....	39
3.3.2.1	Lungenfunktion	39
3.3.2.2	Hämodynamisches Monitoring	41
3.3.3	Fluss durch den aorto-aortalen Shunt	44
3.3.4	Funktionalität des aorto-kardialen Shunts	44
3.3.5	Echokardiographie der Klappen.....	46
3.3.6	Adspektorische Untersuchung der Lunge am Tag der Klappenexplantation	48
3.3.7	Makroskopische Untersuchung der Klappenprothesen nach dreimonatiger Beobachtungszeit.....	48
3.3.4	Mikroskopische Befunde	50
3.3.4.1	Rasterelektronenmikroskopie.....	50

3.3.4.2	Lichtmikroskopie (Immunhistochemie)	54
3.3.4.3	Fluoreszenzmikroskopie	56
4	Diskussion	57
4.1	Verwendetes Tiermodell – mögliche Narkoseschwierigkeiten.....	57
4.2	Diskussion des heterotopen Klappenmodells.....	59
4.3	Diskussion der Versuchsdurchführung	62
4.4	Diskussion der Resultate.....	64
4.4.1	makroskopische Untersuchung der Klappen.....	64
4.4.2	mikroskopische Untersuchung der Klappen	65
4.5	Einschränkungen des Modells und Ausblick	67
5	Zusammenfassung	68
6	Summary	70
7	Literaturverzeichnis	72
8	Tabellenverzeichnis	81
9	Abbildungsverzeichnis.....	82
10	Abkürzungsverzeichnis.....	84
11	Danksagung.....	85
12	Lebenslauf.....	86

1 EINLEITUNG

In der Bundesrepublik Deutschland erhalten pro Jahr ca. 12.000 Menschen aufgrund einer erkrankten Herzklappe eine Herzklappenprothese. Für den Ersatz der Aortenklappe stehen in der Humanmedizin derzeit drei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: mechanische Prothesen, menschliche Aortenklappen (Homografts) und Klappenprothesen tierischer Herkunft (Xenografts aus Schweine-Aortenklappen bzw. von aus Rinderperikard konstruierten Aortenklappen).

Stentfreie biologische Klappenprothesen zeichnen sich im Vergleich zu mechanischen Prothesen durch bessere hämodynamische Eigenschaften aus (BONOW 1985; EDMUNDS 1987; VRANDECIC et al. 2000). Von Nachteil ist ihre begrenzte Lebensdauer, welche nach bisherigem Wissensstand bei ca. 14 Jahren (Xenografts) bzw. 18 Jahren (Homografts) liegt. Nach dieser Zeit ist es in der Regel zu schweren degenerativen Prozessen und Verkalkungen der Klappe gekommen, sodass die Klappe erneut gewechselt werden muss. Aufgrund von Verwachsungen, die nach dem Primäreingriff entstehen, weist der zweite herzchirurgische Eingriff eine weitaus höhere perioperative Mortalität auf. Hinzu kommt die Belastung für den Patienten durch den hochinvasiven Eingriff.

Der Einsatz von mechanischen Prothesen birgt die Gefahr der Thrombosebildung in sich. Aus diesem Grund ist eine dauerhafte Einnahme von Antikoagulantien nötig, was jedoch zu gefürchteten Komplikationen wie Hirn- oder Nierenblutungen führen kann.

Durch die Beschichtung von biologischen Herzklappenprothesen mit wirtsautologen Zellen erhofft man sich, sowohl die Haltbarkeit der Klappe zu verlängern als auch die Thrombogenität der Klappenoberfläche zu reduzieren und so das Risiko thromboembolischer Zwischenfälle nach biologischem Klappenersatz weiter zu senken.

Eine derartige Beschichtung ist allerdings in vivo bislang noch nicht erfolgreich durchgeführt worden, da sich die Endothelzellen im Blutstrom von ihrer Unterlage ablösen.

Die in den vorliegenden Untersuchungen durchgeführte Behandlung Glutaraldehyd-fixierter Prothesen mit Zitronensäure und eine darauffolgende Beschichtung mit wirtsautologen Fibroblasten verbessert in vitro die Stabilität der Endothelzellschicht (GULBINS et al. 2003). Eine Erprobung dieser Methode im Tierversuch wurde bislang jedoch nicht durchgeführt und ist deshalb Ziel dieser Untersuchungen.

EINLEITUNG

Für die Implantation der Herzklappen soll in der vorliegenden Arbeit ein neues Klappenmodell vorgestellt werden, bei welchem die Implantation der Prothese heterotop in die Aorta descendens von Schafen erfolgt. Des Weiteren soll gezeigt werden, dass durch Anlage eines Shunts von der Aorta descendens (proximal der implantierten Klappe) zum linken Vorhof der Blutfluss durch die Klappenprothese so gestaltet werden kann, dass die Segelbewegungen der implantierten Klappe mit den Segelbewegungen der Klappe in orthotoper Position vergleichbar sind.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Biologische Aortenklappenprothesen beim Menschen

Die ersten Aortenklappenhomografts beim Menschen werden im Jahr 1962 durch DONALD ROSS implantiert (ROSS 1962). Im Jahre 1965 folgt die Implantation der ersten biologischen Aortenklappenprothese tierischen Ursprungs (Xenograft) (BINET et al. 1965). Die Ergebnisse dieser Implantationen sind anfänglich zufriedenstellend, jedoch zeigt sich an den implantierten Klappen nach einiger Zeit eine zunehmende Häufung von degenerativen Prozessen (GALLO et al. 1988; COHN et al. 1989; MAGILLIGAN et al. 1989). Aus diesem Grund ist der Einsatz von biologischen Aortenklappenprothesen, bei denen eine Antikoagulationstherapie nicht zwingend notwendig ist, in den meisten klinischen Einrichtungen auf ein Patientenspektrum beschränkt, bei dem eine Antikoagulationstherapie kontraindiziert ist (EDWARDS et al. 1995) bzw. auf ältere Patienten über 65 bis 70 Jahre (BURR et al. 1995; EDWARDS et al. 1995; PUPELLO et al. 1995). Bei der letztgenannten Patientengruppe weist die Prothese in 97,5% bzw. 76,5% der Fälle zehn bzw. 15 Jahre nach Implantation keine Anzeichen von Klappendegeneration auf (BURR et al. 1995).

Im Hinblick auf die hämodynamischen Eigenschaften sind die biologischen Klappenprothesen mechanischen Prothesen überlegen (SCHMIDT und BAIER 2000; FARZANEH-FAR et al. 2001). Dies trifft besonders für diejenigen biologischen Prothesen zu, welche sich durch das Fehlen eines Halteapparates (sog. Stent) auszeichnen. In einer Studie von GROSS et al. (1995) weisen sie lediglich einen transvalvulären Druckgradienten von 11 ± 4 mmHg (Xenografts) bzw. 5 ± 1 mmHg (Homografts) auf, weshalb es nach biologischem Klappenersatz zu einem Remodelling des vorher hypertrophierten bzw. dilatierten Herzens kommt (PIBAROT et al. 1999; JASINSKI et al. 2000). Die Größe des transvalvulären Druckgradienten spiegelt das Ausmaß der durch eine Herzklappe erzeugten Stenose wider. Da eine Aortenklappenstenose aufgrund der resultierenden erhöhten Druckbelastung (Nachlast) zur Entwicklung einer Linksherzhypertrophie führt (WALTHER et al. 2000), sollte eine Herzklappenprothese einen möglichst niedrigen transvalvulären Druckgradienten aufweisen.

Aufgrund der relativ hohen Thrombogenität mechanischer Prothesen verlangt dessen Implantation eine dauerhafte Einnahme von Antikoagulantien. Die daraus resultierende Blutungsneigung führt jährlich in 1% bis 2% der Patienten entweder zu tödlichen bzw.

schwerwiegenden Komplikationen, die der stationären Aufnahme in ein Krankenhaus bedürfen. Für Patienten mit porzinen Xenografts, welche in der Regel auf die Einnahme von Antikoagulantien verzichten können, liegt die Häufigkeit dieser Komplikationen bei 0,1% bis 0,3% (EDWARDS et al. 1995).

2.2 Tiermodelle für Klappenprothesen

Auf der Suche nach einem geeigneten Tiermodell zur Beurteilung von Herzklappenprothesen sind in der Vergangenheit bereits etliche Studien durchgeführt worden. LEVY et al. (1983) entwickelten beispielsweise ein Tiermodell, bei welchem einzelne Klappensegel subdermal in Ratten verpflanzt werden. Dieses Tiermodell ist zwar für anfängliche Studien hilfreich, jedoch kann anhand dieses Modells keine Aussage bezüglich Klappenveränderungen in Abhängigkeit von Blutfluss und den dadurch auf die Klappen wirkenden Scherkräften gemacht werden.

Kälber bieten von ihrer Hämodynamik her optimale Voraussetzungen für Herzklappenversuche, da sie in der Regel eine gute Myokardkontraktilität und ein hohes Schlagvolumen aufweisen (GREGORIC et al. 2001). Aufgrund anatomischer Schwierigkeiten (u.A. nur sehr kurze Aorta ascendens) wird auf diese Spezies jedoch im Zuge von Herzklappenstudien nur selten zurückgegriffen (GREGORIC et al. 2001). Ein weiterer Nachteil der Verwendung von Kälbern besteht darin, dass Langzeitstudien kaum möglich sind, da die Tiere wegen ihres raschen Wachstums schnell zu groß für ihre Prothese werden (ALI et al. 1996).

Schweine zeigen ebenfalls die Problematik des raschen Wachstums; hinzu kommt die Tatsache, dass sie verglichen mit anderen Tierarten vom handlang her relativ schwierig sind (ALI et al. 1996).

Hunde (AASEN et al. 1980; BIANCO et al. 1986; GONZALEZ-LAVIN et al. 1988) waren lange Zeit das traditionelle Modell für Herzklappenstudien, jedoch weist diese Spezies eine höhere Empfänglichkeit für Bakteriämien und Thrombosen auf (ALI et al. 1996). Außerdem führten gesetzliche Regulationen dazu, dass man sich von diesem Tiermodell entfernte (ALI et al. 1996).

Im Jahre 1997 führen LEHNER et al. Herzklappenprothesen-Versuche bei Affen durch, allerdings macht die Studie keine Aussage über den Erfolg des verwendeten Tiermodells.

Am weitesten verbreitet ist heutzutage der Einsatz von Schafen, da Herzgröße, Herzfrequenz, Schlagvolumen und intrakardiale Drücke denen des Menschen ähnlich sind (HERIJGERS et al. 1999). Außerdem gelten Schafe –im Besonderen junge, wachsende Schafe- als sogenanntes Mineralisationsmodell (GOLDSTEIN et al. 2000): Klappenveränderungen, die sich bei diesen Tieren schon einige Monate nach Implantation erkennen lassen, sind beim Menschen erst nach mehreren Jahren zu erwarten (BARNHART et al. 1982). Größter Nachteil dieser Spezies ist die hohe Prävalenz vorbestehender Pneumonien (IRWIN et al. 1993).

Während der in den vergangenen Jahren durchgeführten Studien an Schafen wurden diverse Operationsmethoden zur Erprobung von Klappenprothesen getestet. Implantationen in aortaler (ALI et al. 1996; GREHAN et al. 2001), mitraler (THIENE et al. 1989; OGLE et al. 2003) oder tricuspidaler Position (BARNHART et al. 1982; THIENE et al. 1989) sind zwar häufig durchgeführte, aber technisch sehr aufwendige Operationen, da man sich stets einer extrakorporalen Zirkulation bedienen muss. Diese Operationsmodelle sind mit einer hohen perioperativen Mortalitätsrate verbunden, hauptsächlich bedingt durch massiven Blutverlust (ALI et al. 1996; HERIJGERS et al. 1999). Einige Arbeitsgruppen führen eine Operationsmethode durch, bei der sie die Klappenprothese in ein von der Herzspitze (linker Ventrikel) zur Aorta descendens verlaufendes Conduit einbauen (Abb. 1) und anschließend die Aorta ascendens ligieren (CHEN et al. 1994; GOTT et al. 1997). Mit diesem technisch ebenfalls schwierigen Modell umgehen sie zwar die Notwendigkeit einer extrakorporalen Zirkulation, es kommt jedoch auch hier zu einer hohen Verlustrate bedingt durch schwere Blutungen, ventrikuläre Arrhythmien, Nachlasterrhöhung und Myokardischämie. Nur 16 von 40 operierten Schafen (40%) überleben die frühe postoperative Phase (GOTT et al. 1997).

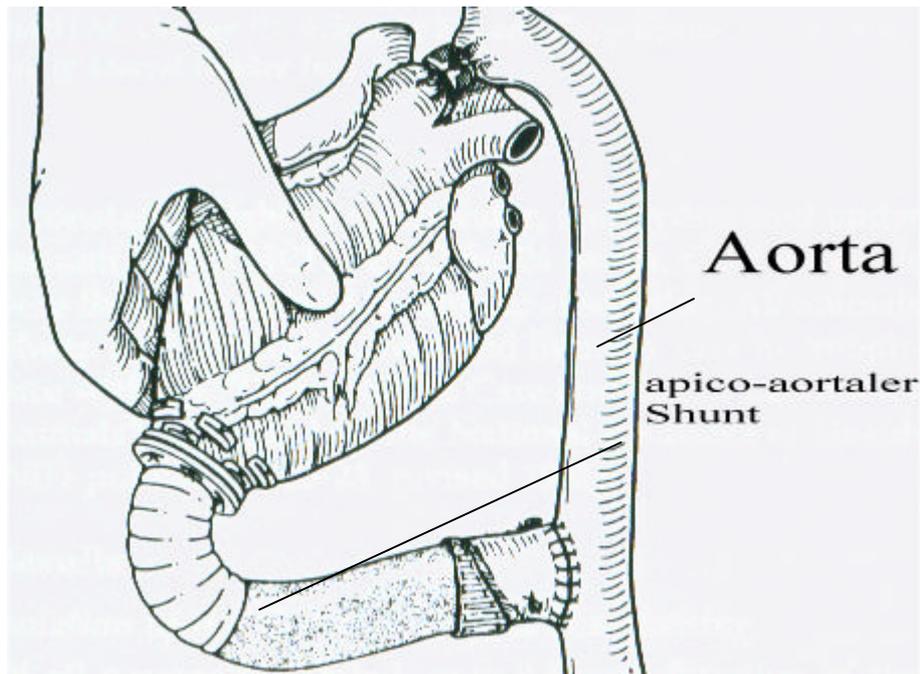


Abbildung 1: Der apico-aortale Shunt; aus GOTT et al. (1997)

In dem von HERIJGERS et al. (1999) etablierten Modell wird die Klappenprothese in die A. pulmonalis implantiert. Bei dieser Methode kann unter Zuhilfenahme eines sogenannten „right ventricular assist device“ auf die Verwendung einer extrakorporalen Zirkulation verzichtet werden. Mit Hilfe dieses Systems kann der Blutfluss unter Umgehung des rechten Ventrikels und der A. pulmonalis vom rechten Vorhof direkt zur Aufzweigung der Pulmonalarterie geleitet werden. Die Mortalität in dieser Studie liegt bei 25% (HERIJGERS et al. 1999).

2.2.1 Problematik der Transplantation in orthotoper Position

Wie bereits erwähnt, ist die Operation am offenen Herzen mit einem hohen technischen Aufwand und in den meisten Fällen mit der Notwendigkeit einer extrakorporalen Zirkulation verbunden. Die Mortalitätsrate scheint den technischen Anspruch und die Invasivität der Operation zu reflektieren. So beträgt in einer Studie von ALI et al. (1996) die Mortalitätsrate bei der Transplantation von Klappenprothesen in aortaler Position 24,2%, während die Mortalitätsrate bei der Transplantation von Klappenprothesen in tricuspider oder pulmonaler Position lediglich mit einer Mortalitätsrate von 13,1 % verbunden ist (Todesfälle später als zwei Monate post operationem jeweils ausgenommen). Diese Operationen werden

unter normothermen Bedingungen am schlagenden Herzen durchgeführt, während für die Implantation von Klappenprothesen in aortaler Position hypotherme Bedingungen und Kardioplegie notwendig sind (ALI et al. 1996). In einer neueren Studie von TIMEK et al. (2002) werden stentfreie porcine Xenografts in mitraler Position implantiert. Diese technisch anspruchsvolle Operation geht mit einer Mortalitätsrate von 68,2 % einher. Neben den bei technisch aufwendigen Operationen gehäuft auftretenden gefährlichen Blutungen scheint bei Verwendung einer extrakorporalen Zirkulation die Bypass-Dauer für die Mortalitätsrate von Bedeutung zu sein. So kann gezeigt werden, dass die Mortalitätsrate bei kürzerer Bypass-Dauer und ansonsten gleichbleibenden Versuchsbedingungen deutlich abnimmt (TIMEK et al. 2002). Grund hierfür scheint vor allem die Tatsache zu sein, dass durch eine kürzere Bypass-Dauer seltener ein Lungenversagen resultiert.

Die Erhöhung des pulmonalen Blutdrucks nach kardiopulmonalem Bypass ist ein seit längerem bekanntes Phänomen, welches unter anderem für das Lungenversagen und die dadurch erhöhte Mortalität nach Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine verantwortlich gemacht wird (REDDY et al. 1997; MCMULLAN et al. 2000). Dies gilt besonders für Patienten mit vorbestehender pulmonaler Hypertonie (BURROWS et al. 1986). Der genaue Mechanismus der Blutdruckerhöhung ist nicht bekannt, aber es wird angenommen, dass es sich um eine komplexe Interaktion von vasoaktiven Substanzen handelt, welche nach Verletzung des pulmonalen Gefäßendothels (z.B. akute alveoläre Hypoxie während kardiopulmonalem Bypass) synthetisiert und freigesetzt werden (MCMULLAN et al. 2000). Insbesondere Endothelin 1 scheint in diesem Zusammenhang von Bedeutung zu sein. So kann im Schafmodell gezeigt werden, dass sowohl der Plasma-Endothelin-Spiegel als auch der pulmonale Gefäßwiderstand nach kardiopulmonalem Bypass deutlich ansteigen (REDDY et al. 1997). Wird vor Anschluss einer Herz-Lungen-Maschine ein nicht-selektiver Endothelin-Rezeptor-Blocker (PD 145065) verabreicht, ist eine Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes nicht zu beobachten (REDDY et al. 1997).

Nach Verwendung eines kardiopulmonalen Bypasses erleiden alle Patienten ein gewisses Maß an akuter Lungenschädigung (KIM et al. 1997). Ursächlich für diese Schädigung ist auf der einen Seite eine hämorrhagische Entzündung als Antwort auf eine Kontaktaktivierung durch die extrakorporale Zirkulation. Auf der anderen Seite führen die mechanischen Veränderungen, die ein solcher Eingriff mit sich bringt, zu einer Schädigung der Lunge (KIM et al. 1997). Die Bandbreite der Schädigungen ist immens und reicht von mikroskopisch kleinen Veränderungen ohne klinische Konsequenz bis hin zu einer dramatischen Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit nachfolgender akuter respiratorischer Insuffizienz (ARDS) (KIM

et al. 1997). Neben der Freisetzung von Endothelin 1 (REDDY et al. 1997) wird in diesem Zusammenhang als Hauptursache die beim Einsatz einer extrakorporalen Zirkulation stattfindende Aktivierung der Komplementkaskade (CHENOWETH et al. 1981; KIRKLIN et al. 1983) gesehen (KIM et al. 1997). Die nach solchen Eingriffen beobachtete Leukopenie ist höchstwahrscheinlich durch diese Komplementaktivierung in Verbindung mit pulmonaler Leukozytensequestrierung zu erklären (DRIES et al. 1984; KIM et al. 1997). Bei der histologischen Untersuchung von Schaflungen nach kardiopulmonalem Bypass finden sich im Regelfall ein interstitielles Ödem, Austreten von Erythrozyten in den Alveolarraum und Schwellung der Endothelzellen (KIM et al. 1997).

Das weiter oben angesprochene gehäufte Auftreten schwerwiegender Blutungen während herzchirurgischen Eingriffen unter extrakorporaler Zirkulation scheint nicht alleine auf den hohen technischen Anspruch zurückzuführen zu sein. KIM et al. (1997) bemerken verlängerte Blutungszeiten und führen diese auf eine temporäre Dysfunktion der Thrombozyten zurück, während DRIES et al. (1984) nach kardiopulmonalem Bypass zwar eine signifikante Thrombozytopenie beobachten, jedoch nur eine minimale Veränderung der Thrombozytenaggregation.

2.3 Gründe für die Verkalkung von Glutaraldehyd-fixierten Herzklappenprothesen

Kommerziell erhältliche biologische Herzklappenprothesen werden zur Herabsetzung der Antigenität meist mit Glutaraldehyd fixiert. Dadurch wird zusätzlich die Festigkeit des Gewebes erhöht, was die Handhabung der Prothesen bei der Implantation erleichtert. Der Mechanismus der Fixierung ist komplex und nicht vollständig verstanden, es wird jedoch angenommen, dass Glutaraldehyd über eine Quervernetzung der Proteine (Bildung einer Schiff-Base zwischen Glutaraldehyd-Molekülen und freien Amino-Gruppen von Kollagenen) die Antigenität der Oberfläche senkt (KIM et al. 1999; GULBINS et al. 2003). Großer Nachteil Glutaraldehyd-fixierter Klappenprothesen ist jedoch die Tatsache, dass sie eine hohe Verkalkungstendenz aufweisen (CHEN et al. 1994; GOTT et al. 1997; VYAVAHARE et al. 1997; LEE et al. 1998; VYAVAHARE et al. 1998), wodurch sie häufig nach einigen Jahren unbrauchbar werden und erneuert werden müssen. Der Mechanismus der Verkalkung

Glutaraldehyd-fixierter Herzklappenprothesen ist nicht genau bekannt. Fünf verschiedene Theorien zur Verkalkung von Glutaraldehyd-fixierten Klappenprothesen werden diskutiert:

1. Glutaraldehyd-Moleküle bzw. Glutaraldehyd-Kondensationsprodukte und freie Aldehydgruppen an der Oberfläche der Klappenprothese führen zu dessen Verkalkung (CHANDA 1995; WEISSENSTEIN et al. 2000). Diese Theorie wird jedoch von einigen Wissenschaftlern in Frage gestellt (KIM et al. 1999), zumal im Tiermodell gezeigt werden kann, dass die Fixierung von porzinen Aorten mit höheren Konzentrationen von Glutaraldehyd das Ausmaß der Verkalkung senkt (ZILLA et al. 1997b). Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass Glutaraldehyd-Moleküle bzw. freie Aldehydgruppen zwar durchaus einen pro-kalzifizierenden Effekt zeigen, dass jedoch bei steigender Glutaraldehydkonzentration der anti-kalzifizierende Effekt des Glutaraldehyds überwiegt (WEISSENSTEIN et al. 2000). Der angesprochene anti-kalzifizierende Effekt kommt durch die oben genannte vollständige Quervernetzung der Proteine zustande.
2. Die Zusammensetzung der organischen Matrix spielt eine Rolle bei der Verkalkung Glutaraldehyd-fixierter Klappen.

Für die Verkalkung von Blutgefäßen ist die Präzipitation von Hydroxyapatit von besonderer Bedeutung. Obwohl der Extrazellularraum in Bezug auf die Präzipitation von Hydroxyapatit übersättigt ist, treten im Körper Mineralisationsvorgänge physiologischerweise nur begrenzt auf. Es wird angenommen, dass dieses Phänomen unter anderem damit zusammenhängt, dass für die Phasenumwandlung (Lösung ? fester Kristall) Energie notwendig ist (FARZANEH-FAR et al. 2001). Die dazu benötigte Energie kann jedoch durch Anwesenheit eines festen Kristallisationskernes reduziert werden. Organische Komponenten der Matrix, wie Kollagen (LEVY et al. 1986; KIM et al. 1999), andere Matrixproteine (v.a. Phosphoproteine) (GURA et al. 1997; KIM et al. 1999) und Lipide (FARZANEH-FAR et al. 2001) stellen eventuell solche Kristallisationskerne dar. Osteocalcin, ein Vitamin-K-abhängiges Protein, welches bereits in anderen dystrophisch verkalkten Geweben isoliert wurde, konnte auch in verkalkenden Glutaraldehyd-fixierten Klappenprothesen gefunden werden (LEVY et al. 1983) und spielt möglicherweise eine Rolle im Mineralisationsprozess.

Für die Mineralisation von Knochengewebe werden des Weiteren sogenannte Matrix-Vesikel verantwortlich gemacht. Matrix-Vesikel-ähnliche Strukturen können in biologischen Klappenprothesen an Verkalkungszonen gefunden werden (SCHOEN et al. 1992; FARZANEH-FAR et al. 2001).

3. Mechanischer Stress spielt eine Rolle bei der Verkalkung Glutaraldehyd-fixierter Klappenprothesen.

Implantiert man Glutaraldehyd-fixierte Herzklappenprothesen in orthotoper Position in den Kreislauf, so kann beobachtet werden, dass sich Verkalkungszonen vermehrt an Stellen mechanischer Belastung finden (THUBRIKAR et al. 1983).

4. Beschädigung der Zellen führt zu Verkalkung Glutaraldehyd-fixierter Herzklappenprothesen.

Zellbeschädigung, beispielsweise durch Behandlung mit Glutaraldehyd, führt zu einem massiven Einstrom von Kalzium-Ionen in die Zelle (TRUMP und BEREZESKY 1992; KIM et al. 1999; FARZANEH-FAR et al. 2001). Es wird angenommen, dass eine Inhibition der membranständigen Ca^{2+} -ATPase zu dieser massiven intrazellulären Kalziumerhöhung führt (EYBL et al. 1989). Dieses Enzym hält unter physiologischen Bedingungen einen niedrigen intrazellulären Kalziumspiegel aufrecht (EYBL et al. 1989). Des Weiteren kann gezeigt werden, dass die Beschädigung von Zellen außerdem zu einer Erhöhung der intrazellulären Phosphatkonzentration führt (KIM et al. 1999). Damit erreicht das Ionenprodukt $[\text{Ca}^{2+}] \times [\text{P}_i]$ intrazellulär Werte, welche für eine heterogene Kristallisation ausreichen (KIM et al. 1999).

5. Das Fehlen eines schützenden Endothels auf der Oberfläche der Klappenprothesen führt neben Thrombozyten- und Fibrinablagerungen auch zu dystrophischen Verkalkungsreaktionen (LEHNER et al. 1997). Obwohl es durch die Behandlung mit Glutaraldehyd zu einer Quervernetzung der Gewebsproteine und einer daraus resultierenden deutlichen Verminderung der Oberflächenantigenität kommt, kann gezeigt werden, dass durch höhere Konzentrationen von Glutaraldehyd bzw. durch Zusatz von Reagenzien, welche die Quervernetzung zusätzlich steigern (L-Lysin), die Mineralisation von Klappensegeln um über 30% gemindert werden kann (WEISSENSTEIN et al. 2000).

Immunologische Reaktionen spielen laut CHANDA (1995) in der ersten Phase nach Implantation der Prothese jedoch keine Rolle. Er vertritt die Meinung, dass anfänglich überflüssige Glutaraldehyd-Moleküle bzw. freie Aldehydgruppen für die Mineralisation verantwortlich sind, während in einer späteren Phase immunologische Faktoren eine Rolle spielen (CHANDA 1995).

Neben der Verwendung von Glutaraldehyd ist in der Behandlung mit UltiFix eine andere Möglichkeit der Klappenfixierung zu sehen. Eine Behandlung mit Ultifix führt zu einer Stabilisierung des Gewebes durch Bildung von Amidbrücken. Literaturangaben zufolge ist die Quervernetzung durch UltiFix der durch Glutaraldehyd vergleichbar (TIMEK et al. 2002). Im Gegensatz zu Glutaraldehyd-fixierten Klappen scheinen UltiFix fixierte Klappen sowohl im subdermalen Rattenmodell als auch im Schafmodell nicht zu verkalken (GIRARDOT et al. 1997).

Weitere Fixationsmethoden, wie z.B. Photofixation, Carbodiimid/Hydroxysuccinimid-Behandlung oder Ethanol/Glycerol-Behandlung mit anschließender Kryofixation werden zur Zeit getestet (NEUENSCHWANDER und HOERSTRUP 2004).

2.3.1 Gegenmaßnahmen zur Mineralisation

Die Frage nach einer geeigneten Methode zur Verhinderung von Verkalkungsreaktionen beim Einsatz Glutaraldehyd-fixierter Klappenprothesen beschäftigt die Wissenschaft nun schon seit vielen Jahren. HIRSH et al. (1993) zeigen, dass eine Beschichtung mit Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) das Ausmaß der Verkalkung von Aortenklappenprothesen reduzieren kann. Grund hierfür ist wahrscheinlich die durch SDS induzierte Extraktion von Phospholipiden aus der Klappenprothese. Wie oben bereits erwähnt, stellen (Phospho-)Lipide mögliche Kristallisationskerne für eine Verkalkungsreaktion dar (FARZANEH-FAR et al. 2001).

Einen ähnlichen Ansatz wählen 1997 VYAVAHARE et al.: vor Implantation der Glutaraldehyd-fixierten Klappenprothesen führen sie eine Präinkubation mit Ethanol durch (VYAVAHARE et al. 1997). Es wird angenommen, dass die durch diese Maßnahme erreichte Reduzierung der Verkalkungsreaktion zum einen durch eine Extraktion von Phospholipiden und Cholesterol begründet ist. Zum anderen kann nachgewiesen werden, dass es durch die Vorinkubation mit Ethanol zu irreversiblen Veränderungen der Kollagenstruktur der Klappe kommt (VYAVAHARE et al. 1997; VYAVAHARE et al. 1998; VYAVAHARE et al. 2000). Allerdings werden durch die Präinkubation mit Ethanol nicht alle Anteile der Klappenprothese in gleichem Maße vor einer Verkalkung geschützt: Während an den Klappensegeln die Verkalkung deutlich vermindert werden kann, stellt man im Bereich der Aortenwand keinen bzw. nur einen unzureichenden inhibitorischen Effekt durch Ethanol fest (LEE et al. 1998).

Von Aluminiumchlorid (AlCl_3) kann gezeigt werden, dass es die Mineralisation der Aortenwand verhindert (WEBB et al. 1990; WEBB et al. 1992). OGLE et al. (2003) finden heraus, dass eine Behandlung der Aortenwand mit AlCl_3 und eine darauffolgende Behandlung der gesamten Prothese mit Ethanol die Verkalkung von sowohl Aortenwand als auch Klappensegel im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Glutaraldehyd-fixiert, ohne weitere Behandlung) signifikant reduzieren kann, während eine Behandlung der kompletten Klappenprothese mit AlCl_3 und Ethanol zu einer signifikant höheren Kalzifikationsrate führt (OGLE et al. 2003).

1992 veröffentlichen GOTT et al. eine Studie zu einer neuen Antimineralisationsbehandlung mit α -Aminoölsäure (AOA). Es wird angenommen, dass der Antimineralisations-Effekt durch Bindung von AOA an freie Aldehyd-Bindungsstellen des Glutaraldehyds zustande kommt (GOTT et al. 1997; FLAMENG et al. 2001).

Auch CHANDA (1995) macht vor allem das Vorhandensein freier Aldehydgruppen an der Oberfläche des Implantats und die Freisetzung von überschüssigem Glutaraldehyd für die initiale Mineralisation verantwortlich. Deshalb schlägt er eine Behandlung der Glutaraldehyd-fixierten Klappen mit dem Biopolymer Chitosan vor. Durch eine Vielzahl von Amino-Termini ist ein Molekül Chitosan in der Lage, eine relativ große Anzahl an freien Aldehydgruppen zu binden. CHANDA (1995) teilt die Verkalkungsreaktion in zwei Stadien ein: das erste durch freie Aldehydgruppen und überschüssiges Glutaraldehyd bedingte Stadium beginnt direkt nach Implantation der Glutaraldehyd-fixierten Klappe und kann durch den Einsatz von Biopolymeren (z.B. Chitosan) abgeschwächt werden. Das zweite Stadium hingegen ist vor allem durch immunologische Reaktionen bedingt und resultiert in einem schleichenden Degenerationsprozess, welchem nur mit Hilfe geeigneter Methoden der Elimination von hochantigenen Substanzen entgegengewirkt werden kann (CHANDA 1995).

WEISSENSTEIN et al. (2000) zeigen, dass eine Detoxifikation von Glutaraldehyd-fixierten Klappenprothesen mit Hilfe von Urazol zu einer Mineralisationsreduktion von 61,7% führt. Durch Verwendung von Urazol können selbst geringste Mengen von freien Glutaraldehyd-Kondensationsprodukten eliminiert werden (ZILLA et al. 1997a).

ZILLA et al. (1997b) beschreiben einen Zusammenhang zwischen der Konzentration des bei der Fixierung verwendeten Glutaraldehyds und dem Grad der Mineralisation: höhere Konzentrationen von Glutaraldehyd resultieren in einer verminderten Verkalkung von porzinen Aortenwänden. WEISSENSTEIN et al. (2000) beobachten das gleiche Phänomen bei der Fixierung von Klappensegeln. Um zu untersuchen, ob eine weitere Verbesserung der Quervernetzung zu einer zusätzlichen Mineralisationsverminderung führt, konzipieren sie einen Parallelansatz, bei dem sie Glutaraldehyd-fixierte Klappen zusätzlich mit L-Lysin behandeln. L-Lysin ist ein Diamin, welches nach Verbindung mit zwei Aldehyd-Gruppen (Schiff-Base) eine Quervernetzung von Proteinen über eine weitere Distanz ermöglicht. Die durchgeführte Lysin-Behandlung senkt die Mineralisation im Vergleich zu ausschließlich Glutaraldehyd-fixierten Klappen signifikant (WEISSENSTEIN et al. 2000).

Einen anderen Ansatz, von dem man sich erhofft, den Mineralisationsprozess (ggf. nach vorheriger Behandlung der Herzklappenprothesen mit einer der oben genannten Methoden) noch weiter reduzieren zu können, bietet das sogenannte „tissue engineering“. In vitro kann gezeigt werden, dass eine Oberflächenbeschichtung zu einer Verminderung der Kalziumaufnahme in die Zelle führt (DAHM et al. 1996; DAHM et al. 2001). Durch das Tissue Engineering erhofft man sich außerdem eine weitere Reduzierung thromboembolischer Zwischenfälle bei Patienten mit biologischem Klappenersatz (GULBINS et al. 2003). Das Fehlen eines intakten Endothels wird von einigen Autoren für die Ablagerung von Thrombozyten verantwortlich gemacht (FRATER et al. 1992; LEHNER et al. 1997).

Im Rahmen des Tissue Engineerings werden autologe Endothelzellen des Empfängers entweder in vitro oder in vivo auf die Klappenprothese verbracht (LEYH et al. 2003b). Die somit geschaffene natürliche Oberfläche soll als schützende Barriere dienen und die schleichende Abstoßungsreaktion verhindern.

Bei der Auswahl der Endothelzellen scheint die Herkunft (Arterie/ Vene) keinen signifikanten Einfluss zu haben. In einer Studie werden Pulmonalarteriensegmente mit venösen oder arteriellen Endothelzellen beschichtet: in der venösen Gruppe kann eine nicht-signifikant höhere Kalzium-Konzentration und ein ebenfalls nicht-signifikant geringerer Kollagen- und Gesamtzellanteil festgestellt werden (SHINOKA et al. 1998; STOCK et al. 2002).

Da die Herzklappen großen Druckbelastungen ausgesetzt ist, müssen die Zellen auf einer stabilen Unterlage angesiedelt und vermehrt werden. Als eine solche Unterlage kommen entweder biologische oder künstliche Prothesen (z.B. aus Poly-Urethan) in Frage (SCHENKE-LAYLAND et al. 2003).

2.4 Tissue Engineering von Herzklappen und damit verbundene Probleme

Erste Versuche des Tissue Engineerings von Herzklappen werden 1995 durchgeführt (SHINOKA et al. 1995). Zur Rekonstruktion von Pulmonalklappen verwenden SHINOKA et al. ursprünglich ein künstliches Klappengerüst aus Polyglactin und Polyglycolsäure. Andere Arbeitsgruppen verwenden seitdem ebenfalls biologisch abbaubare künstliche Gerüste zur Beschichtung mit Endothelzellen (WALLUSCHECK et al. 1996; STOCK et al. 2000), jedoch ist bis heute noch keine Methode bekannt, diese Gerüste stabil mit Endothelzellen zu beschichten (STOCK et al. 2000; LEYH et al. 2003b; SCHENKE-LAYLAND et al. 2003). WALLUSCHECK et al. (1996) unterziehen künstliche Gefäßprothesen aus Polytetrafluoroethylen einer Behandlung mit einem die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) enthaltenden Polypeptid und erzielen damit eine Verbesserung der Anheftungsfähigkeit von Endothelzellen (in vitro); diese beträgt ca. 30% im Vergleich zu nur 15% bei unbehandelten Polytetrafluoroethylen-Prothesen (WALLUSCHECK et al. 1996). Neben dieser Erhöhung der Anheftungsfähigkeit von Endothelzellen wird RGD-enthaltenden Derivaten außerdem die Eigenschaft zugesprochen, die Bindung von Fibrinogen an aktivierte Thrombozyten zu verhindern (KIDANE et al. 2003).

Als Gerüst für eine Endothelzell-Beschichtung könnten biologische Materialien eine Alternative zu biologisch abbaubaren künstlichen Materialien darstellen (WILSON et al. 1995):

1. Xenogene/ Allogene Matrix

In diesem Fall werden Herzklappen (Xenografts/ Allografts) verwendet, welche entweder enzymatisch oder mit verschiedenen Detergentien dezellularisiert worden sind (STOCK et al. 2002). Diese dezellularisierten Klappen werden anschließend entweder in vitro mit Endothelzellen beschichtet (eigentliches Tissue Engineering), oder eine Rebesiedelung wird erst in vivo nach Implantation der Klappe in den Empfänger bzw. das Empfängertier angestrebt (sog. „guided tissue regeneration“) (STOCK et al. 2002). STEINHOFF et al. (2000) führen eine Studie durch, bei der sie das Ergebnis einer In-vitro-Beschichtung mit dem einer In-vivo-Rebesiedelung vergleichen. Die Klappen werden jeweils für drei Monate als Pulmonalklappenersatz

bei Schafen implantiert: eine In-vitro-Beschichtung mit autologen Myofibroblasten und Endothelzellen zeigt nach Explantation der Klappen in 100% der Fälle einen zusammenhängenden Zellrasen (Endothelzellen, Myofibroblasten), während die Klappen nach einer In-vivo-Rebesiedelung lediglich fokal mit Endothelzellen und Myofibroblasten besiedelt sind (STEINHOFF et al. 2000). Andere Ergebnisse erzielen LEYH et al. (2003a) bei einer ähnlich aufgebauten Studie: hier werden in vivo rebesiedelte und in vitro beschichtete Pulmonalklappen in orthotoper Position bei Schafen implantiert. Nach einer Dauer von sechs bzw. 12 Monaten werden die Klappen explantiert und miteinander verglichen. Histologisch zeigt sich bei den in vitro beschichteten Klappen eine pathologisch veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in Kombination mit einer erhöhten Zellularität sowie einer inhomogenen Besiedelung mit Endothelzellen. Die in vivo rebesiedelten Klappen hingegen weisen eine normal aufgebaute Extrazellulärmatrix sowie einen kontinuierlichen endothelialen Monolayer auf (LEYH et al. 2003a).

Der Versuch, eine In-vitro-Aortenklappenbeschichtung nach ähnlichem Prinzip durchzuführen, gelingt bisher aufgrund ungenügender mechanischer Stabilität nicht (SCHENKE-LAYLAND et al. 2003).

2. Dünndarm-Submukosa (SIS)

Porzine Dünndarm-Submukosa kann als Material für ein resorbierbares Klappengerüst verwendet werden (VOYTIK-HABRIN et al. 1997; BADYLAK et al. 1998). In einem Versuch beim Schwein kann gezeigt werden, dass gleichzeitig mit der Resorption der Submukosa-Matrix ein Aufbau von Bindegewebe stattfindet. Die Bildung von Endothel kann ebenfalls nachgewiesen werden. Die Klappen sind sowohl direkt nach Implantation als auch zum Zeitpunkt der Explantation voll funktionstüchtig (MATHENY et al. 2000).

3. Fibrin Gel

Ein neuer, noch nicht näher untersuchter Ansatz ist die Verwendung von Fibrin-Gel als biologische Gerüstsubstanz (JOCKENHOEVEL et al. 2001). Fibrin-Gel zeichnet sich dadurch aus, dass Zellen leicht in das Gel eingebettet werden können und dass der Abbau dieses Materials durch den Einsatz von Aprotinin kontrolliert werden kann (STOCK et al. 2002).

SCHRIFTTUM

Matrix	Herkunft	Behandlung	Zellen	Kommentar
Synthetisch	Verschiedene biologisch abbaubare Polymere	Mit Ethylenoxid sterilisiert	Mit autologen Myofibroblasten und Endothelzellen beschichtet	Sicher; vollständig autolog; Wachstum; Beschichtung häufig kompliziert
Biologisch	Xenogen oder Homogen	Glutaraldehyd-fixiert	Azellulär	Sicher; Verkalkung; keine Repopulation
			Mit autologen Zellen beschichtet	Erhöhte Haltbarkeit; schwierig zu beschichten
		Alternative Fixierungsmethoden (z.B. Photofixation, Kryopräservation)	Azellulär	Sicherheit und immunologische Situation nicht ausreichend geprüft
			Mit autologen Zellen beschichtet	Verbesserte Anheftungsfähigkeit der Zellen;
		Dezellularisiert	Azellulär	Sicherheit und immunologische Situation nicht ausreichend geprüft
			Mit autologen Zellen beschichtet	

Tabelle 1: Übersicht zu möglichen Klappenersatzmaterialien nach NEUENSCHWANDER und HOERSTRUP (2004)

4. Glutaraldehyd-fixierte Klappenprothesen

Durch die Beschichtung von herkömmlich fixierten Klappenprothesen erhofft man sich, eine verminderte Klappenmineralisation zu erreichen und außerdem die Gefahr von thromboembolischen Zwischenfällen weiter senken zu können (FISCHLEIN et al. 1994; LEHNER et al. 1997; GULBINS et al. 2003; NEUENSCHWANDER und HOERSTRUP 2004).

Eine zufriedenstellend stabile Endothelzellbeschichtung kann trotz vielfacher Versuche (BENGTSSON et al. 1993; FISCHLEIN et al. 1994; LEHNER et al. 1997) jedoch noch nicht erreicht werden (GULBINS et al. 2003). Für diese Tatsache wird im Allgemeinen vor allem die Zytotoxizität des Glutaraldehyds bzw. deren Produkte (EYBL et al. 1989; GULBINS et al. 2003; NEUENSCHWANDER und HOERSTRUP 2004) verantwortlich gemacht. Glutaraldehyd-Fixationslösungen enthalten nicht ausschließlich das lineare Monomer, sondern auch dihydratisierte Formen, monomere und polymere Halbacetale sowie Aldol-Kondensationsprodukte (SCHMIDT und BAIER 2000). Die dauerhafte Freisetzung dieser Chemikalien wird von vielen Autoren verdächtigt, nicht nur eine Verkalkungsreaktion hervorzurufen, sondern auch das spontane Wachstum von Endothelzellen zu verhindern (EYBL et al. 1989; MORITZ et al. 1990; GRIMM et al. 1992; SCHMIDT und BAIER 2000). BENGTSSON et al. (1993) gelingt eine In-vitro-Besiedlung mit Endothelzellen nach gründlichem Auswaschen von überschüssigem Glutaraldehyd; allerdings beginnen die Zellen am zweiten Tag nach dem Verbringen auf die Klappen, sich abzurunden und vom Untergrund zu lösen (BENGTSSON et al. 1993).

LEHNER et al. (1997) gelingt ebenfalls eine zusammenhängende In-vitro-Besiedlung mit Endothelzellen, jedoch bleibt diese nach In-vivo-Implantation in Affen nicht stabil.

Nach genauerer Betrachtung der Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Valenzen auf der Oberfläche Glutaraldehyd-fixierter Klappen stellen GULBINS et al. (2003) die Hypothese auf, dass die unbefriedigende Anheftungsfähigkeit von Zellen vor allem auf einer reduzierten Hydrophilie nach Quervernetzung durch Glutaraldehyd beruht. Die erwünschte Quervernetzung der Oberflächenproteine wird durch die Reaktion zwischen Glutaraldehyd und Amino-Gruppen erreicht. Die Reaktion zwischen einem Glutaraldehyd-Molekül und einer Amino-Gruppe resultiert in der Ausbildung einer Schiff-Base (Abb. 2). Diese reagiert nun entweder erneut mit einer zweiten Amino-Gruppe, oder sie reagiert mit einer Aldehydgruppe im Sinne einer

Aldol-Kondensation. Sowohl die Aldol-Kondensation als auch die Ausbildung einer Schiff-Base führen zu einer zunehmenden Hydrophobie der Klappenoberfläche und damit zu einer verminderten Zellanheftung. Eine Verbesserung der Zellanheftung kann durch die Behandlung mit Zitronensäure erzielt werden. Es wird angenommen, dass die vier Carboxyl-Gruppen der Zitronensäure mit Amino-Gruppen von Kollagenen unter Salzbildung reagieren (Abb. 3) und so die Hydrophilie deutlich erhöhen (GULBINS et al. 2003).

Außerdem finden GULBINS et al. (2003) heraus, dass auf einer Glutaraldehyd-fixierten Unterlage Fibroblasten gegenüber Endothelzellen eine bessere Anheftungsfähigkeit besitzen. Aus diesem Grund empfehlen sie vor der endgültigen Beschichtung mit Endothelzellen eine Besiedlung mit Fibroblasten.

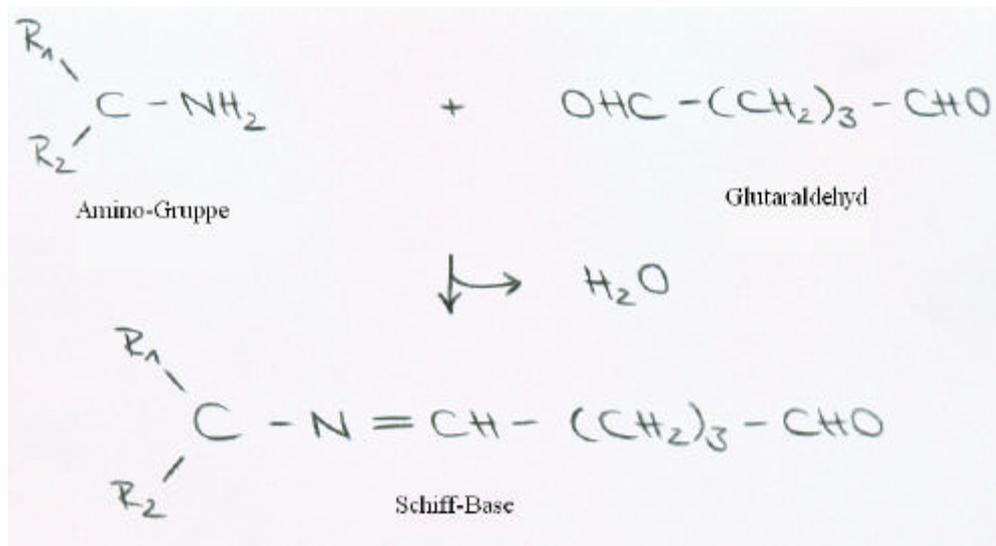


Abbildung 2: Bildung einer Schiff-Base

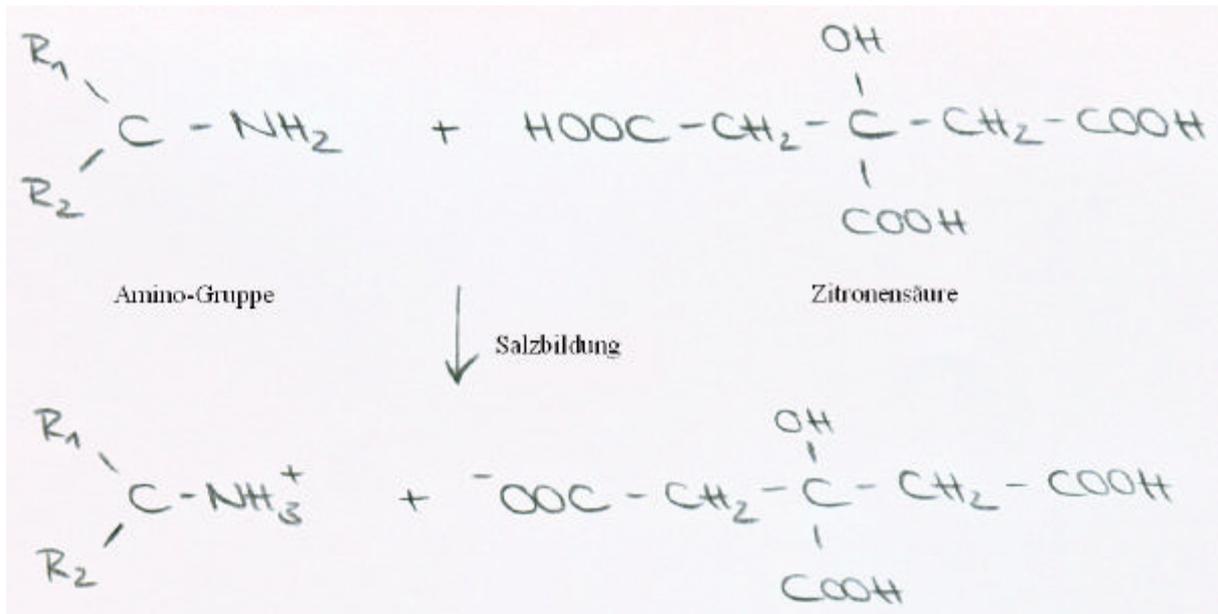


Abbildung 3: Salzbildung durch Reaktion mit Zitronensäure

2.5 Toxizitätsreduktion von Glutaraldehyd

Neben dem Versuch, toxisches Glutaraldehyd durch sorgfältiges Auswaschen der Klappenprothese zu beseitigen (BENGTSSON et al. 1993), setzen viele Arbeitsgruppen in der Vergangenheit eine Inkubation der Klappe mit verschiedenen Aminosäuren ein. Besonders die Inkubation mit Aminosäuren mit niedrigen pH-Werten führt zu einer deutlichen Verbesserung der Zellbeschichtung (FISCHLEIN et al. 1994).

Durch Vorbehandlung Glutaraldehyd-fixierter Klappen mit L-Glutamat kann in mehreren Studien eine erfolgreiche Beschichtung mit Endothelzellen erreicht werden (EYBL et al. 1992; GRIMM et al. 1992).

ZILLA et al. (1997a) und WEISSENSTEIN et al. (2000) beschreiben eine Methode, mit der selbst geringste Mengen freien Glutaraldehyds eliminiert werden können: die Behandlung mit Urazol soll eine Detoxifikation von Glutaraldehyd-beschichteten Klappen ermöglichen.

Eine relativ neue Methode zur Senkung der Zytotoxizität Glutaraldehyd-fixierter Klappen besteht in einer Lyophilisierung (Gefriertrocknung) der Klappen. Bei dieser Methode werden Glutaraldehyd-fixierte Klappen zunächst gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, anschließend gefriergetrocknet und zu guter Letzt wieder in physiologische Kochsalzlösung verbracht (MAIZATO et al. 2003).

Untersuchungen von DAHM et al. (2001) zielen auf die Fragestellung ab, ob durch einen Überzug mit Polymeren eine bessere Anheftungsfähigkeit von Endothelzellen auf Glutaraldehyd-fixierten Klappen erreicht werden kann. Dafür wählen sie unterschiedliche Ansätze mit zehn verschiedenen hydrophilen Polymeren und vergleichen deren Auswirkung auf Zellwachstum und Adhäsivität des Endothels. Fünf der zehn ausgewählten Polymere, darunter das bereits unter 2.3.1 (Antimineralisationsbehandlung) genannte Chitosan ermöglichen initial eine vollständige Endothelzellbeschichtung, wobei bei zwei Polymeren (darunter ebenfalls Chitosan) die Adhäsivität nach einer Woche nachlässt.

2.6 Nachweis von Endothelzellaktivität

Metabolische Zellaktivität von Endothelzellen kann entweder durch Prostacylin (PGI₂)-Messungen (GONZALEZ-LAVIN et al. 1988; FISCHLEIN et al. 1992; FISCHLEIN et al. 1994) oder durch immunhistochemische Färbung von Kollagen IV oder Faktor VIII (GULBINS et al. 2003) nachgewiesen werden. Kollagen IV wird physiologischerweise nur von Endothelzellen synthetisiert.

2.7 Die „Freestyle“-Aortenklappe

Bei der in der vorliegenden Studie verwendeten „Freestyle“-Aortenklappe handelt es sich um eine im Handel erhältliche und in der Herzchirurgie vielfach verwendete Klappenprothese. Für die Fixierung der Prothese wird Glutaraldehyd verwendet. Die Fixierung erfolgt unter 40 mmHg ohne transvalvulären Druckgradienten. Nach Fixierung mit Glutaraldehyd erfolgt eine weitere Behandlung mit α -Aminoölsäure (HERIJGERS et al. 1999).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielvorstellungen

In der vorliegenden Arbeit soll eine neue Operationsmethode zur Erprobung von Herzklappenprothesen untersucht werden, bei der man die Prothese heterotop in die Aorta descendens implantiert. Durch die Anlage eines Shunts von der Aorta descendens (proximal der implantierten Klappe) zum linken Vorhof erhofft man sich, den Fluss durch die implantierte Prothese so gestalten zu können, dass diastolisch ein Klappenschluss auftritt. Die Funktionalität des implantierten Shunts und Klappenbewegungen sollen mit Ultraschall dargestellt werden.

Außerdem soll in der vorliegenden Arbeit die Frage beantwortet werden, ob eine dauerhafte Endothelzellbeschichtung von Glutaraldehyd-fixierten Klappenprothesen unter In-vivo-Bedingungen möglich ist. Aus diesem Grund wird den Versuchstieren in Allgemeinnarkose je ein Teilstück der Vena jugularis entnommen. Diese Venenstücke dienen der Gewinnung von Fibroblasten und Endothelzellen. Auf die wirtsautologe Beschichtung der Glutaraldehyd-fixierten Klappenprothesen mit den gewonnenen Zellen folgt die Implantation der Prothesen in die Aorta descendens. Nach einer dreimonatigen Beobachtungszeit werden die implantierten Prothesen in tiefer Allgemeinnarkose entnommen und die Tiere euthanasiert. Es folgt die lichtmikroskopische sowie rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Klappen.

Zusammenfassend lassen sich drei Hauptzielgrößen nennen:

1. Etablierung eines heterotopen Klappenmodells am Schaf
2. Erhalt der Segelbewegungen durch Anlage eines Shunts proximal der implantierten Klappe zum linken Vorhof
3. Dauerhafte Endothelzell-Besiedlung der Klappen unter In-vivo-Bedingungen

Als Nebenzielgröße ist die Verminderung von Thrombenbildung und degenerativen Prozessen (Verkalkungen) an den Klappen zu nennen.

3.2 Material und Methodik

3.2.1 Klappenprothesen

Zum Einsatz kommen Aortenklappenprothesen „Freestyle“ der Firma Medtronic, Inc (Minneapolis, Minn., USA). Bei den verwendeten Prothesen handelt es sich um stentfreie porzine Klappenprothesen mit Durchmessern von 21 mm bzw. 23 mm. Die „Freestyle“-Klappen bestehen aus einer intakten Aortenwurzel, wobei die Abgänge für die Koronararterien jeweils ligiert sind (siehe Abb. 4).

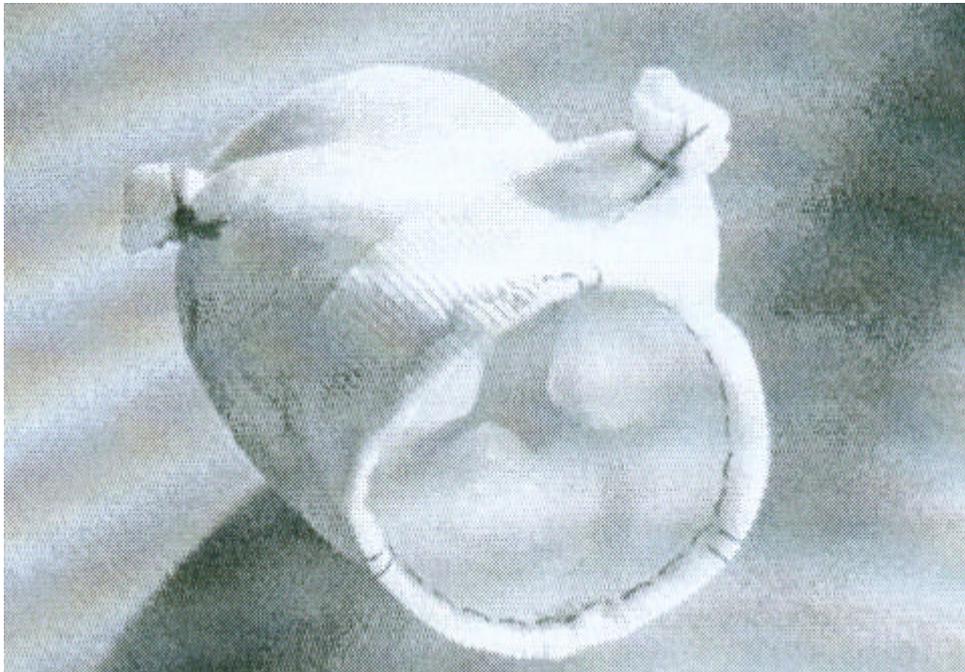


Abbildung 4: Die Freestyle-Klappe

3.2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere werden 11 weibliche ausgewachsene Bayerische Bergschafe eingesetzt. Die Tiere haben ein durchschnittliches Lebendgewicht von 60 kg, das Alter der Tiere beträgt in etwa zwei Jahre.

Die Tiere stammen aus einem Bestand von ca. 300 Tieren. Sie werden im Sommer hauptsächlich auf Almen (Weidehaltung) gehalten, im Winter leben sie in Gruppen von 30 bis 40 Tieren in einem Tiefstreulaufstall auf Stroh. In diesem Schafstall bestehen Raumtemperaturen von ca. 10 bis 20°C und eine Unterdruckbelüftung. Hierbei wird die Abluft über einen Ventilator an der Stalldecke aktiv aus dem Raum geleitet, während die Zuluft durch den resultierenden Unterdruck passiv in den Stall strömt. Die relative Luftfeuchtigkeit beträgt 60 bis 80%. Als Futter werden Heu, Grassilage und geringe Mengen an Zuckerrübenschnitzel verwendet. Des Weiteren stehen den Tieren Mineral- und Salzlecksteine zur Verfügung.

Zwei Tage vor der Operation werden die Tiere in die Tierräume des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Ismaninger Str. 22, München gebracht. In diesen Räumen leben die Schafe in Gruppen von zwei bis drei Tieren auf Einstreu. Vier bis fünf Tage nach der Operation werden sie in einen Tiefstreulaufstall des Instituts für Tierernährung, Oberwiesenfeld, München, transportiert, wo sie -auf Stroh aufgestallt- für den gesamten dreimonatigen Beobachtungszeitraum verbleiben.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2.3 Versuchsplan

1. Schritt: Den zu der Versuchsgruppe gehörigen Tieren wird unter Allgemeinanästhesie ein ca. 7 cm langes Teilstück der rechten Vena jugularis externa entnommen.
2. Schritt: Aus dem entnommenen Venenstück werden Endothelzellen und Fibroblasten isoliert, in Kultur gebracht und mit einem Fluoreszenz-Farbstoff angefärbt. Nach ausreichender Vermehrung der Zellen werden diese auf die für das jeweilige Tier vorgesehene Klappenprothese verbracht. Von der Entnahme der Venenstücke bis zur Implantation der besiedelten Klappe (Schritt 3) vergehen 34 bis 48 Tage.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3. Schritt: Unter Allgemeinanästhesie werden den Tieren der Versuchsgruppe die
(entspricht Tag 0) mit autologen Zellen besiedelten Aortenklappen heterotop in die Aorta descendens implantiert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhalten entsprechend unbeschichtete Aortenklappenprothesen.

4. Schritt: Unter Allgemeinanästhesie erfolgt die Explantation der Prothesen und
(entspricht Tag 90-112) die anschließende Euthanasie der Tiere. Es folgt die histologische bzw. rasterelektronenmikroskopische Aufarbeitung der entnommenen Klappen.

	Versuchsgruppe (8 Tiere)	Kontrollgruppe (3 Tiere)
	Entnahme eines Teilstückes der rechten Vena jugularis externa	
	Isolierung von Endothelzellen und Fibroblasten mit anschließender Vermehrung in Kultur; Anfärbung der Zellen und Besiedlung der Klappenprothese	
Tag 0	Implantation der beschichteten Prothese	Implantation einer herkömmlichen Prothese
Tag 90 – 112	Entnahme der Prothese; Euthanasie des Tieres	Entnahme der Prothese; Euthanasie des Tieres

Tabelle 2: Übersicht über die Gruppeneinteilung und den Versuchsablauf

3.2.4 Versuchsdurchführung

3.2.4.1 Anästhesie

Sämtliche Eingriffe werden unter Vollnarkose (ERHARDT et al. 2004) durchgeführt. Aus diesem Grund wird den Schafen 36 h vor Narkoseeinleitung kein Futter mehr angeboten. Etwa 12 h vor Narkosebeginn erhalten die Schafe Meloxicam (0,4 mg/kg, s.c.; Metacam®, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim) im Sinne einer präemptiven Analgesie. Zur Sedation wird den Tieren Diazepam (0,5 mg/kg, i.m.; Diazepam-ratiopharm® 10 Injektionslösung, ratiopharm GmbH, Ulm) verabreicht; 15 min. später erfolgt Präoxygenierung und Legen eines venösen Zugangs. Die Narkoseeinleitung wird mit Ketaminhydrochlorid (4 mg/kg, i.v.; Narketan® 10, CHASSOT GmbH, Ravensburg) und Propofol (2,5-3,5 mg/kg, i.v.; Propofol 2% MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) durchgeführt.

Es folgt die Intubation mit Endotrachealtuben der Größen 10 bzw. 11. (high volume - low pressure cuff; Willy Rüsch AG, Kernen). Nach Intubation erfolgt das Aufrechterhalten der Narkose mit Isofluran (1,0 – 1,5 Vol%; Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) in Sauerstoff (ca. 60 Vol%) und Raumluft über eine intermittierende positive Druckbeatmung (IPPV; Servo-Ventilator 900D, Siemens-Elema, Schweden) in Kombination mit einer Propofol (2%)-Dauertropfinfusion (12-17 ml/h).

Das Atemminutenvolumen beträgt ca. 10 l, die Atemfrequenz wird auf 17/min eingestellt, der bei diesen Einstellungen erreichte Spitzendruck (P_{peak}) beträgt hierbei 16 bis 24 mbar.

Zur besseren analgetischen Abdeckung wird neben dem oben angegebenen Meloxicam Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm® 1, ratiopharm GmbH, Ulm) in einer Dosierung von 25 mg/kg i.v. verabreicht und bei Durchführung einer Thorakotomie zusätzlich ein paracostaler Nervenblock mit 8 ml Bupivacainhydrochlorid (Bucain® 0,25%, curasan AG, Kleinostheim) gesetzt.

Als Antibiose erhalten die Tiere je 1g Ampicillin und 0,5 g Sulbactam (Unacid® 1,5 g, Pfizer GmbH, Karlsruhe). Das hierdurch abgedeckte Erregerspektrum schließt eine Vielzahl grampositiver und gramnegativer Erreger ein.

3.2.4.2 Entnahme eines Teilstücks der Vena jugularis

Vorbereitung der Tiere für die Operation

Unter Allgemeinanästhesie (siehe Kap. 3.2.4.1) wird die rechte ventrale Halsregion im mittleren Drittel des Halses geschoren und das Schaf auf dem Operationstisch in linke Seitenlage gebracht. Der Kopf wird hierbei leicht nach dorsal und links überstreckt, um die rechte ventrale Halsregion mit ihrer Drosselrinne besser zu exponieren. Das Operationsgebiet säubert und desinfiziert man und deckt den restlichen Tierkörper mit sterilen Tüchern ab.

Um einer durch Gärungsvorgänge im Pansen induzierten Magenaufgasung entgegenzuwirken, legt man über die Maulhöhle eine Magensonde.

Den Tieren wird Ringer-Lösung (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) entsprechend dem Erhaltungsbedarf (ca. 10 bis 20 ml/kg/h) intravenös infundiert.

Das Narkosemonitoring beinhaltet Pulsoximetrie, Spirometrie, Kapnometrie, EKG und nicht-invasive Blutdruckmessung an einer Vorderextremität (siehe Kap. 3.2.6).

Venenentnahme

Nach Inzision der Haut über der Drosselrinne etwa auf halber Höhe des Halses wird die rechte Vena jugularis externa auf einer Strecke von ca. 10 cm freigelegt. Unter Schonung der umliegenden Strukturen wird die Vene von ihrer Unterlage freipräpariert und die abgehenden Gefäße ligiert. Nach proximaler und distaler Ligatur der Vene wird der sich zwischen den beiden Ligaturen befindliche Teil entnommen und in ein Aufbewahrungsmedium M-199 Earle (Natriumcarbonat 2,2g/l, M-199, Biochrom) gegeben.

Nach Einlegen einer Drainage wird die Wunde wieder verschlossen. Durch Einbeziehung des Unterhautgewebes in die Hautnaht wird die Wundhöhle so klein wie möglich gehalten.

3.2.4.3 Aufbereitung der Venenstücke und Beschichtung der porzinen Aortenklappen

Die Lumina der entnommenen Venenstücke werden mit einer Pufferlösung gespült und anschließend für 20 Minuten in 0,1% Kollagenase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) bei 37°C und CO₂ 5% inkubiert. Nach dieser Zeit unterbricht man die Kollagenase-Reaktion und zentrifugiert die Zellsuspension bei 1000 U/min für 10 Minuten.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die abzentrifugierten Zellen werden in Endothelzellmedium (EC growth medium, PromoCell GmbH, Heidelberg) resuspendiert und in Kultur verbracht.

Zur Gewinnung der Fibroblasten werden die entnommenen Venenstücke abermals in 0,1% Kollagenase inkubiert (30 min.) und anschließend bei 1000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Danach erfolgt eine Resuspendierung der Zellen in Fibroblastenmedium (fibroblast growth medium, PromoCell GmbH, Heidelberg) und die anschließende Verbringung in Kultur.

Nach Erreichen eines zusammenhängenden Zellrasens werden zum Splitten der Zellkulturen beide Zelltypen mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst, zentrifugiert, in das entsprechende Zellmedium verbracht und anschließend erneut ausgesät.

Vor Beschichtung der „Freestyle“-Klappen mit den aus der Zellkultur erhaltenen Zellen werden die Endothelzellen mit dem Intravital-Fluoreszenz-Farbstoff PKH-26 markiert. Hierbei handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, welcher in die Zellmembran eingelagert wird. Bei Verlust der Integrität der Zellmembran durch Zusammenbruch des Membranpotentials (Zelltod) geht der Farbstoff sofort verloren, Zellteilung verdünnt ihn.

Die Glutaraldehyd-fixierten Klappenprothesen werden zunächst für 24 Stunden in M-199 (s.o.) inkubiert (4°C) und daraufhin mit 10%iger Zitronensäure vorbehandelt (5 min.). Anschließend werden sie bis zum Wiedererlangen eines neutralen pH mit destilliertem Wasser gespült. Nach Einspannen der Klappen in eine „Zellbeschichtungs-Vorrichtung“ füllt man diese Vorrichtung zunächst für die Fibroblasten-Beschichtung mit Fibroblastenmedium (s.o.) und der zuvor hergestellten Fibroblastensuspension (s.o.). Sämtliche Oberflächen der Prothesen werden mit Fibroblasten vorbeschichtet. Nach dieser Vorbeschichtung bewahrt man die Klappen für sieben Tage unter Kulturbedingungen auf und beschichtet sie anschließend mit den markierten Endothelzellen. Das Beschichtungsverfahren verläuft analog zu dem gerade beschriebenen Verfahren; es wird jedoch ausschließlich die luminale Seite der Klappenprothese beschichtet. Die vollständige Beschichtung der Klappe dauert etwa vier Wochen. Die Aufbewahrung der fertig beschichteten Klappen erfolgt in oben genanntem Endothelzellmedium (PromoCell GmbH, Heidelberg).

Vor der Implantation der fertig beschichteten Klappen werden von jeder Prothese ca. 3 mm große repräsentative Stücke der Klappenwand entnommen. Die Ergebnisse der histologischen und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung dieser Stücke vergleicht man später mit den nach dreimonatiger Implantation gewonnenen Stücken.

3.2.4.4 Thorakaler Eingriff

Vorbereitung der Tiere für die Operation

Unter Allgemeinanästhesie (siehe Kap. 3.2.4.1) wird die linke Thoraxseite großflächig geschoren und -nach rechtsseitiger Lagerung des Tieres auf dem Operationstisch- gesäubert und desinfiziert. Anschließend erfolgt die Abdeckung des restlichen Tierkörpers mit sterilen Tüchern.

Um einer durch Gärungsvorgänge im Pansen induzierten Aufgasung entgegenzuwirken, wird über die Maulhöhle eine Magensonde vorgeschoben.

Als Infusion wird den Tieren Ringer-Lösung (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) entsprechend dem Erhaltungsbedarf (ca. 10 bis 20 ml/kg/h) intravenös verabreicht.

Das Narkosemonitoring beinhaltet Pulsoximetrie, Spirometrie, Kapnometrie, EKG, invasive (A. auricularis caudalis) und nicht-invasive (Blutdruckmanschette, linke Vordergliedmaße) Blutdruckmessung (siehe Kap. 3.2.6).

Implantation der Klappenprothese

Die Eröffnung des Thorax erfolgt linksseitig im 4. Interkostalraum. Unter Zuhilfenahme eines Rippenspreizers wird der Thorax soweit eröffnet, dass nach Beiseitedrängen der linken Lungenlappen die thorakale Aorta descendens sichtbar wird. Es erfolgt die Heparinisierung des Tieres mit 100 IE/kg Heparin-Natrium (Liquemin® N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen). Nach partiellem Ausklemmen der Aorta distal des Abgangs der A. subclavia sinistra (proximal der Implantationsstelle der Klappenprothese) wird eine Gefäßprothese (Gore-tex, Durchmesser 8 mm) als End-zu-Seit-Anastomose an die Aorta genäht. Analog dazu wird das andere Ende dieser Gefäßprothese nun distal des Abgangs der ersten Interkostalarterien mit der Aorta verbunden und so eine künstliche Kollaterale geschaffen (aorto-aortaler Shunt, siehe Abb. 5).

Die Aorta wird ausgeklemmt und durchtrennt. Die porcine Aortenklappenprothese („Freestyle“, Ø 21-23 mm, Medtronic, Inc., Minneapolis, Minn., USA) wird als End-zu-End-Anastomose in die thorakale Aorta implantiert. Nach Überprüfung der Anastomosen auf Blutdichtigkeit wird der Fluss über die Aorta wieder freigegeben. Den zuvor angelegten Shunt unterbindet man distal und setzt ihn ab.

Die Wand des linken Herzohrs wird partiell ausgeklemmt. Nach Inzision des Herzohres wird das distale freie Ende des Shunts auf den linken Vorhof genäht (Abb. 6). Nach Entlüftung des

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Shunts wird die Klemme vom linken Herzohr abgenommen und damit der Blutfluss durch den Shunt freigegeben. Dieser sorgt nun - bedingt durch das zum linken Vorhof gerichtete Druckgefälle - für eine Sogwirkung. Ein Teil des Blutes, welches - bedingt durch die Windkesselfunktion der Aorta - normalerweise auch während der Diastole durch die Klappenprothese strömen würde, wird nun durch den angelegten Shunt „umgeleitet“. Der durch den Shunt erzeugte Sog soll den Druck proximal der implantierten Klappe soweit senken, dass es zu passiven systolisch-diastolischen Klappenbewegungen der Prothese kommt. Durch Veränderung des Shuntdurchmessers kann die Durchflussrate verändert und damit die Herzbelastung kontrolliert werden.

Nach Blähen der Lunge und Einlegen einer Schlauchdrainage mit Heimlich-Ventil wird die Wunde schichtweise verschlossen.

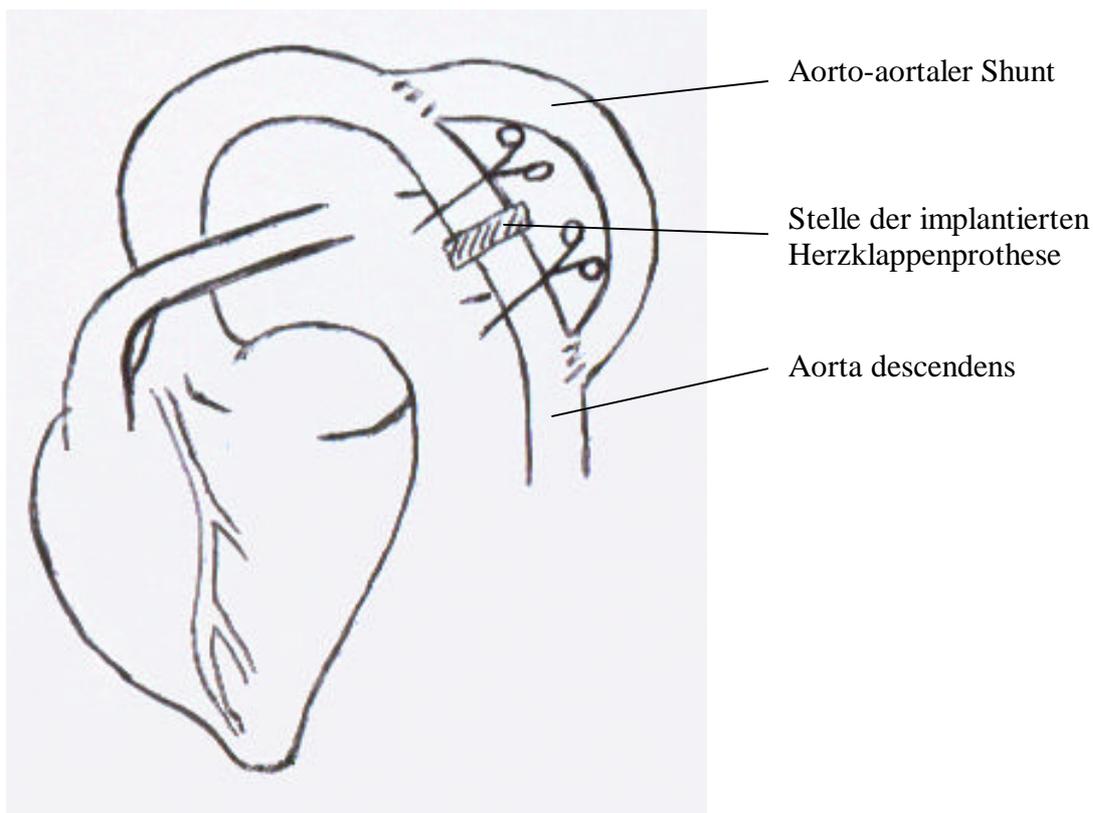


Abbildung 5: Der aorto-aortale Shunt, Schema

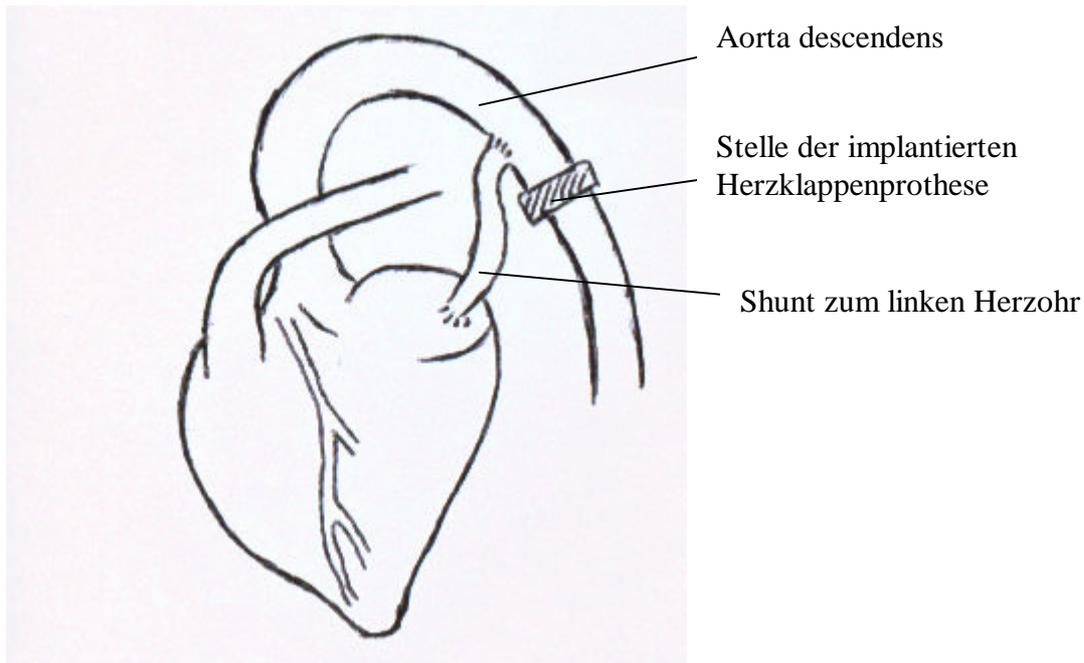


Abbildung 6: Der aorto-kardiale Shunt, Schema

3.2.5 Monitoring

3.2.5.1 Lungenfunktion

Da während einer Thorakotomie durch den Wegfall des Unterdrucks zwischen Thoraxwand und Lunge Spontanatmung nicht möglich ist, wird eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Tiere durch positive intermittierende Druckbeatmung (IPPV; Servo-Ventilator 900D, Siemens-Elima, Schweden) sichergestellt. Hierbei wählt man eine Atemfrequenz von 17/min. Das Atemminutenvolumen (ca. 10 l) wird so gewählt, dass der über die Kapnometrie gemessene endexpiratorische Kohlendioxidwert ($Et\ CO_2$) zwischen 35 und 40 mmHg liegt, wobei der bei diesem Volumen erreichte Spitzendruck (P_{peak}) Werte zwischen 16 und 24 mmHg annehmen sollte. Durch Pulsoximetrie wird die Sauerstoffsättigung (SpO_2) ständig kontrolliert; die Messung erfolgt an der Zunge bzw. der Nasenscheidewand. Des Weiteren werden arterielle Blutgase und Säure-Basen-Status der Tiere kontinuierlich überwacht (Synthesis 10, Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim). Um einer postoperativen Beeinträchtigung der Lungenfunktion durch Bildung von Atelektasen entgegenzuwirken, erfolgt vor Thoraxverschluss (unter Sichtkontrolle) ein vorsichtiges Blähen der Lunge.

3.2.5.2 Hämodynamisches Monitoring

Während der gesamten Narkosedauer erfolgt die Überwachung des Kreislaufes anhand folgender hämodynamischer Parameter:

- ? Herzfrequenz (durch Pulsoximetrie und Elektrokardiographie (bipolare Standardableitungen nach Einthoven))
- ? Blutdruckmessung (sowohl invasive Messung an der A. auricularis caudalis (Datex-Ohmeda, Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland) als auch nicht-invasive Messung über eine Blutdruckmanschette am Unterarm (Memoprint®, S+B medVET GmbH, Babenhausen))
- ? Messung des linken Vorhofdrucks (Datex-Ohmeda, Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland)

Die Messung des linken Vorhofdrucks dient der Abschätzung der Herzbelastung durch den aorto-kardialen Shunt und erfolgt entweder über Pulmonalkatheter als sog. Wedge-Druck oder durch eine an eine Blutdruckmesseinheit (Datex-Ohmeda, Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland) angeschlossene Kanüle, welche durch die Wand der Gefäßprothese in den linken Vorhof vorgeschoben wird. Der Shuntmesser wird so gewählt, dass der Vorhofdruck im Mittel Werte von 12 mmHg nicht überschreitet.

Aufschluss über den aorto-kardialen Shuntfluss gibt zum einen die Palpation des Shunts, zum anderen kann der Shuntfluss mit Dopplersonographie dargestellt werden.

Des Weiteren soll erwähnt werden, dass der expiratorische Kohlendioxidpartialdruck (Et CO₂) nicht ausschließlich von Beatmungsparametern, sondern auch von der Kreislaufsituation des Tieres abhängig ist, und aus diesem Grund neben der Überwachung der Lungenfunktion ebenfalls der Kontrolle der Hämodynamik dient.

3.2.5.3 Organdurchblutung durch den Shunt

Um beurteilen zu können, ob der Blutfluss durch den aorto-aortalen Shunt für die Versorgung der Organe distal des Shunts ausreicht, wird bei abgebundener Aorta der aortale Blutdruck distal der Klappenprothese invasiv gemessen. Dies geschieht über ein flüssigkeitsgefülltes Kathetersystem, wobei eine Kanüle über eine flüssigkeitsgefüllte Perfusorleitung mit einem elektronischen Druckaufnehmer (Medex Inc., Rossendale, England) verbunden ist. Über einen Druckverstärker werden die gemessenen Daten auf einen Monitor übertragen, wo systolischer und diastolischer Blutdruck, sowie arterieller Mitteldruck und Pulsfrequenz nach Verschieben der Kanüle durch die Wand der Gefäßprothese in die Aorta abgelesen werden können.

3.2.5.4 Echokardiographie der Klappen

Die sonographische Darstellung (Vivid FiVe, GE Vingmed Ultrasound A/S, Horten, Norwegen) der Klappenprothese dient der Überprüfung der Segelbewegungen und erfolgt nach Öffnung des aorto-kardialen Shunts. Hierfür wird die Ultraschallsonde bei eröffnetem Thorax unter sterilen Kautelen direkt auf die zu untersuchende Struktur gehalten.

3.2.6 Postoperative Überwachung

Nach Ausleiten der Narkose werden die Tiere zurück in den Stall des Institutes gebracht, wo man sie - nach Wiedererlangen des Schluckreflexes - extubiert. Die postoperative Analgesie wird mit Meloxicam (0,4 mg/kg, Metacam®, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim), Metamizol (25 mg/kg, Novaminsulfon-ratiopharm® 1, ratiopharm GmbH, Ulm) und Buprenorphin (0,005 mg/kg, Temgesic®, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) durchgeführt. Die Dauer der Anwendung richtet sich nach dem Allgemeinbefinden des jeweiligen Tieres. Für ein ausreichendes Futterangebot direkt nach der Narkose wird gesorgt; Wasser wird erst bei ausreichend sicherem Stehvermögen des Tieres angeboten.

Die Fortführung der Antibiose erstreckt sich über einen Zeitraum von sieben Tagen.

Futter- und Wasseraufnahme, Kot- und Urinabsatz, Körpertemperatur, Verhalten in der Tiergruppe sowie Anzeichen von Schmerzen oder „Unwohlsein“ werden genau dokumentiert. Die Thoraxdrainage (Schlauchdrainage mit Heimlich-Ventil) saugt man regelmäßig ab und dokumentiert abgezogene Menge und Beschaffenheit der Flüssigkeit. Sobald keine Flüssigkeit mehr aus der Drainage abgezogen werden kann, wird diese entfernt.

Zeigt ein Tier bei sorgfältiger klinischer Untersuchung ein gutes Allgemeinbefinden - frühestens jedoch nach Entfernung der Thoraxdrainage - so bringt man es für den Rest der dreimonatigen Beobachtungszeit in einen Stall des Institutes für Tierernährung, Oberwiesenfeld, München. Während dieser Zeit werden die Tiere einmal täglich durch einen Tierarzt auf ihr Allgemeinbefinden hin untersucht. Zehn Tage post operationem zieht man bei guter Wundheilung die Hautfäden.

3.2.7 Explantation der Klappen; Euthanasie der Tiere

Ca. 3 Monate nach Implantation erfolgt die Explantation der Klappenprothesen. Die Tiere werden in Narkose gelegt und mit Heparin-Natrium, 100 IE/kg (Liquemin® N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) heparinisiert. Nach Lagerung der Tiere in rechter Seitenlage erfolgt der Zugang zur Aorta descendens in gleicher Weise wie für die Implantation der Klappen beschrieben. Auf makroskopisch auffällige Veränderungen der Lunge wird geachtet. Sowohl Klappenprothese als auch aorto-kardialer Shunt werden sonographisch dargestellt.

Nach Abklemmen der Aorta und Entnahme der porzinen Klappe erfolgt in tiefer Allgemeinnarkose die Euthanasie der Tiere mit Kaliumchlorid (ca. 25 mg/kg bzw. 20 ml einer 7,46%igen 1-M-Kaliumchlorid-Lösung für ein 60 kg schweres Schaf).

3.2.8 Makroskopische Untersuchung der Klappen

Nach Explantation der Klappen werden diese längs aufgeschnitten, fotografiert und hinsichtlich makroskopischer Auffälligkeiten untersucht. Hierbei wird besonders auf den Grad der Endothelialisierung, unphysiologische Auflagerungen, Bildung von Thromben,

Verfärbungen sowie degenerative Prozesse (Sklerosierung, Verkalkung, Formveränderung der Segel) an der Prothese geachtet.

Pro Aortenprothese werden 4 bis 6 repräsentative Stücke entnommen und für die histologische Aufarbeitung entweder in flüssigem Stickstoff (Proben für die Immunhistochemie) oder in Glutaraldehyd (Proben für die Rasterelektronenmikroskopie) konserviert.

3.2.9 Aufbereitung der histologischen Präparate

3.2.9.1 Immunhistochemie

Aus den für die Immunhistochemie bestimmten Proben werden ca. 8µm dicke Schnitte hergestellt. Diese behandelt man zunächst mit monoklonalen Antikörpern gegen Faktor VIII (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg). In einem zweiten Schritt werden die Proben mit markierten polyklonalen Antikörpern gegen vorher verwendete Faktor VIII-Antikörper (Antirabbit Immunglobulin G- Antikörper; Immundiagnostik, Bensheim, Deutschland) markiert und sichtbar gemacht.

Negativkontroll-Färbungen werden durchgeführt, indem die an Faktor VIII bindenden Antikörper weggelassen werden.

3.2.9.2 Rasterelektronenmikroskopie

Nach Fixierung, schonender Entwässerung und vollständiger Trocknung der für die Rasterelektronenmikroskopie vorgesehenen Proben werden diese zur Erhaltung der notwendigen elektrischen Leitfähigkeit mit Gold bedampft.

Unter 500- bis 2000-facher Vergrößerung werden pro Probe 10 Gesichtsfelder ausgewertet. Zeigt die Oberfläche die für ein Endothel typische „Pflasterstein-Morphologie“, so wird sie als Endothel angesprochen. Kann im Mittel mindestens 95% der untersuchten Probe als Endothel angesprochen werden, so wird das Endothel als „konfluierend“ eingestuft.

3.2.9.3 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet man die für die Immunhistochemie hergestellten Präparate. PKH-26 markierte Endothelzellen (siehe Kap. 3.2.4.3) werden unter Durchlichtmikroskopie mit einer Fluoreszenzlampe (Wellenlänge 565 nm) nachgewiesen.

3.2.10 Statistische Auswertung

Die Auswertung der gewonnenen Ergebnisse basiert auf dem Wilcoxon-Test für paarige/ abhängige Stichproben. Dieser Test dient zum Vergleich zweier abhängiger Stichproben, wobei im Unterschied zum t-Test eine Normalverteilung nicht vorausgesetzt wird.

Die in der vorliegenden Studie durchgeführte Operation kann in drei Abschnitte gegliedert werden:

1. Abschnitt: vor Abklemmen der Aorta
2. Abschnitt: während abgeklemmter Aorta
3. Abschnitt: nach Wiedereröffnen der Aorta

Hinsichtlich der Messparameter „Herzfrequenz“ und „systolischer Blutdruck“ werden für jede dieser Operationsabschnitte Mittelwert und Standardabweichung (SD) berechnet. Die Standardabweichung hat jeweils die Einheit des angegebenen Parameters.

Zur Prüfung der Mittelwertunterschiede auf Signifikanz werden die absoluten Beträge der Mittelwertdifferenzen der einzelnen Tiere in eine Rangordnung gebracht und für jede Rangzahl vermerkt, ob die zugehörige Differenz ein positives oder ein negatives Vorzeichen aufweist. Anschließend bildet man die Summe der positiven (R_p) und der negativen (R_n) Rangzahlen und benutzt als Testgröße die kleinere der beiden Rangsummen (R). Ist diese Rangsumme kleiner als der zu dem Signifikanzniveau von 5% ($p = 0,05$) und gegebenem Stichprobenumfang (n) gehörende Tabellenwert, so ist der bestehende Mittelwertunterschied signifikant.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Klinische Erscheinungen

a) Venenentnahme

Die Teilresektion der rechten Vena jugularis verläuft bei sieben der acht Tiere (87,5%) ohne Zwischenfälle. Bei einem Tier kommt es in der Aufwachphase aus der Narkose zu Regurgitation von Mageninhalt mit anschließender Aspiration. Da ein Absaugen des aspirierten Mageninhaltes aus der Lunge nicht in ausreichendem Umfang möglich ist, wird das Tier euthanasiert.

Bei einem weiteren Tier fällt einige Stunden nach der OP eine starke Blutung im Wundgebiet auf. Die Wunde wird in Sedation untersucht. Nach Eröffnung der Hauthefte und Säuberung der Wundhöhle fallen lediglich Sickerblutungen auf. Der Versuch, diese Blutungen mit Hilfe eines Druckverbandes zu stillen, zeigt keinen nachhaltigen Erfolg, sodass das Tier trotz deutlich reduzierten Allgemeinbefindens einen Tag nach der Venenentnahme zwecks Wundrevision erneut in Narkose gelegt werden muss. Während der Narkose verstirbt das Tier an Kreislaufversagen; die Untersuchung der Wunde zeigt, dass sich die Ligatur des proximalen Jugularisstumpfes gelöst hat.

b) Thorakaler Eingriff

Der thorakale Eingriff verläuft bei allen Tieren aus der Versuchsgruppe (100%) komplikationslos. Eins von drei Schafen aus der Kontrollgruppe verstirbt während der Operation aufgrund mangelhafter Entlüftung des aorto-kardialen Shunts. Aufgrund der daraus resultierenden Luftembolie kommt es bei diesem Schaf zu Kammerflimmern. Trotz mehrfacher Defibrillation ist das Kammerflimmern nicht dauerhaft zu beheben.

Ein Schaf aus der Versuchsgruppe verstirbt innerhalb der ersten 24 h post operationem. Hierbei handelt es sich um ein Tier, bei dem bereits intra operationem Veränderungen des Lungengewebes (Verklebungen, atelektatische Bezirke) aufgefallen waren. Das Tier zeigt während der Aufwachphase aus der Narkose keinerlei Auffälligkeiten.

Teilentnahme der rechten Vena jugularis externa; n=8

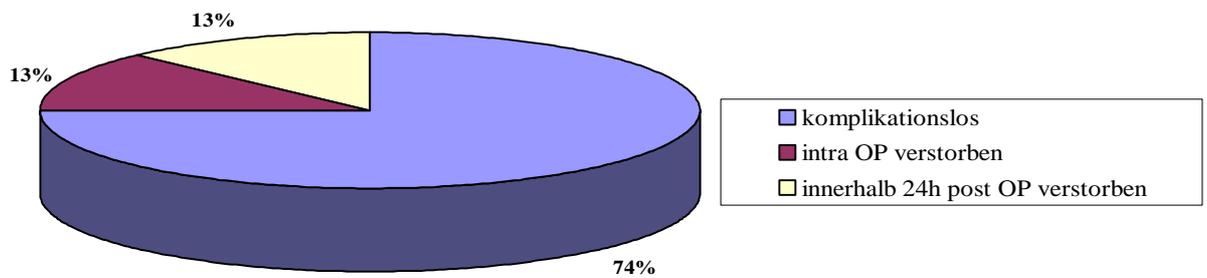


Abbildung 7: Komplikationsrate der Venenentnahme

Thorakaler Eingriff; n=9

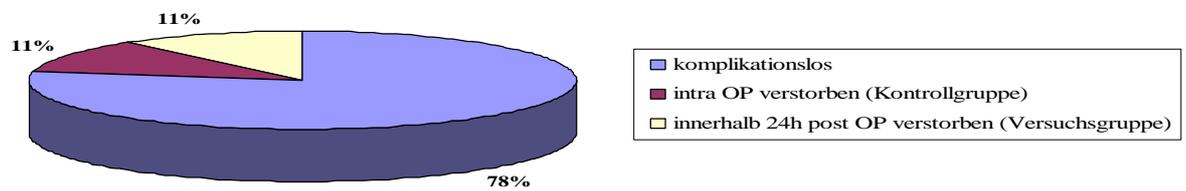


Abbildung 8: Komplikationsrate der Thorakotomie

c) Postoperative Phase

Alle Schafe beginnen innerhalb der ersten Stunde nach Extubation die Futteraufnahme. Kurze Zeit später zeigen die meisten Schafe erste Aufstehversuche. Bei einem Schaf vergeht jedoch etwa eine weitere Stunde, bis es diese Versuche unternimmt. Ein anderes Schaf steht schon wenige Minuten nach Extubation im Aufwachstall.

Stehen die Tiere, so fällt über eine Dauer von ein bis zwei Tagen post operationem eine Entlastung der linken Vordergliedmaße auf.

Bei allen Tieren besteht in den ersten zwei bis vier Tagen post operationem eine deutlich angestrengte Atmung. Die Auskultation des rechten Lungenflügels ist stets unauffällig, während über der linken Lungenhälfte ein deutlich verschärftes Atemgeräusch, v.a. in Form eines feuchten Rasselns zu hören ist. Bei einem Tier sind auskultatorisch bis sieben Tage post operationem linksseitig schlecht belüftete Lungenareale zu finden.

Bei allen Tieren kann nach der Operation blutig-seröse bis wässrige Flüssigkeit aus der Thoraxdrainage abgezogen werden. Die Drainage kann bei drei Tieren einen Tag, bei einem Tier zwei Tage, bei einem Tier drei Tage, bei einem Tier vier Tage und bei einem Tier fünf Tage nach der Operation gezogen werden.

In der ersten Zeit nach dem Thoraxeingriff zeigen die Tiere ein reduziertes Allgemeinbefinden. Sie liegen sehr viel, stehen erst bei Betreten des Stalls durch Pflegepersonal auf, tragen den Kopf gesenkt und zeigen nur wenig Interesse an den anderen Herdenmitgliedern. Ein Schaf lässt trotz konsequenter analgetischer Behandlung über einen Zeitraum von vier Tagen Schmerzzeichen in Form von „Zähneknirschen“ erkennen. Den übrigen Tieren kann nach einem (n=1), zwei (n=2), drei (n=2) und vier (n=1) Tagen nach klinischer Untersuchung ein gutes Allgemeinbefinden attestiert werden.

Ein Schaf wird ca. 22 Stunden nach Aufwachen aus der Narkose leblos im Stall aufgefunden. Dieses Schaf zeigte zuvor in der Aufwachphase keinerlei Auffälligkeiten. Vier Stunden vor Versterben zeigt es ein für diese Phase gewohntes Bild mäßigen Allgemeinbefindens. Auffällig ist ein reduzierter Appetit. Die Pulsfrequenz beträgt 120/min, die Atemfrequenz beträgt 24/min. Die Atmung ist auskultatorisch verschärft. Der Wundverschluss zeigt keinen besonderen Befund, aus der Thoraxdrainage lassen sich bis 20 Stunden post operationem insgesamt 400 ml Flüssigkeit abziehen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Bei der Untersuchung des Tierkörpers fallen atelektatische Lungenareale auf. Im Sinne einer konsolidierten Pneumonie veränderte Lungenareale und Verklebungen der Lunge fielen bereits während der Operation auf.

Nach Auffinden des Tieres erfolgt eine sofortige Entnahme der Klappenprothese mit anschließender histologischer bzw. rasterelektronenmikroskopischer Untersuchung.

3.3.2 Ergebnisse des Narkosemonitorings

3.3.2.1 Lungenfunktion

Zur Beurteilung der Lungenfunktion während der Narkose werden folgende Parameter herangezogen:

- a) Blutgasanalyse
- b) Bestimmung des Säure-Basen-Gleichgewichts
- c) SpO₂ (Pulsoximetrie)
- d) EtCO₂ (Kapnometrie)

Zu a, b) Blutgasanalyse/ Bestimmung des Säure-Base-Gleichgewichts

Die Werte der Blutgasanalyse und des Säure-Base-Gleichgewichts sind in folgender Tabelle dargestellt. Es handelt sich hierbei jeweils um die Werte, welche nach Gewinnung arteriellen Blutes zwei Stunden nach Operationsbeginn ermittelt werden:

	Schaf-Nr.1	Schaf-Nr.2	Schaf-Nr.3	Schaf-Nr.4	Schaf-Nr.5	Schaf-Nr.6	Schaf-Nr.7	Schaf-Nr.8
pH	7,36	7,47	7,52	7,39	7,44	7,39	7,43	7,36
pCO ₂	41,7	39	29,8	39,5	39,1	43,3	41,5	47,8
pO ₂	114,7	105,9	193,9	162	162	162	142	167
HCO ₃ ⁻	23,3	27,8	23,9	24,1	27	26,2	27,5	27,5
BE	-2,2	4,2	1,1	-1,0	2,7	1,0	2,9	1,8

Tabelle 3: Blutgasanalyse (Einheiten: pCO₂ (mmHg); pO₂ (mmHg); HCO₃⁻ (mmol/l); BE (mmol/l))

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zu c) SpO₂ während des Eingriffs

Die Sauerstoffsättigung liegt bei allen Tieren während der Gesamtdauer des thorakalen Eingriffs zwischen 92% und 100% (Tab. 4).

Zu d) Kapnometrie

Das Atemminutenvolumen wird so gewählt, dass der expiratorische Kohlendioxidpartialdruck Werte von 40 mmHg möglichst nicht überschreitet (Tab. 4).

Zeit (in min)	Sauerstoffsättigung		expiratorischer CO ₂	
	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert
0	0,68	99,44	4,37	40,67
10	1,55	99,22	4,82	39,89
20	0,74	99,11	4,71	39,22
30	1,15	99,00	4,78	39,78
40	1,26	99,44	4,74	37,56
50	1,56	99,33	2,98	37,33
60	1,57	98,44	4,18	36,78
70	1,25	98,67	4,74	38,33
80	1,40	98,78	1,87	37,78
90	1,76	98,33	2,87	38,00
100	2,33	98,11	2,74	38,22
110	1,71	98,56	3,17	38,56
120	1,17	98,44	2,36	38,33
130	1,05	98,29	2,05	38,00
140	1,10	98,11	1,97	38,89
150	2,15	97,78	2,50	38,44
160	1,17	98,44	2,59	38,56
170	0,96	98,44	2,73	39,75
180	0,83	98,44	2,78	39,00
190	1,58	98,00	3,16	38,57
200	1,41	98,38	5,95	32,29
210	1,22	98,50	4,53	34,29
220	0,40	99,20	2,87	35,43

Tabelle 4: Sauerstoffsättigung und expiratorische CO₂-Werte während Thorakotomie

3.3.2.2 Hämodynamisches Monitoring

Der Kreislaufstatus lässt sich während der Operation anhand der Parameter „systemischer Blutdruck“, „linksatraler Druck“ und „Herzfrequenz“ (gemessen mit EKG und Pulsoximetrie) beurteilen.

a) Blutdruck:

Der systolische Blutdruck der Tiere liegt vor Abklemmen der Aorta im Mittel bei 110,48 mmHg ($\pm 20,37$). Er verändert sich während des Abklemmens der Aorta im Mittel auf 130,39 mmHg ($\pm 22,04$) und sinkt schließlich nach Wiedereröffnung der Aorta im Mittel auf 103,83 mmHg ($\pm 21,63$) ab (Abb. 9; Tab. 5).

Systolischer Blutdruck während verschiedener Operationsphasen (Mittelwerte)

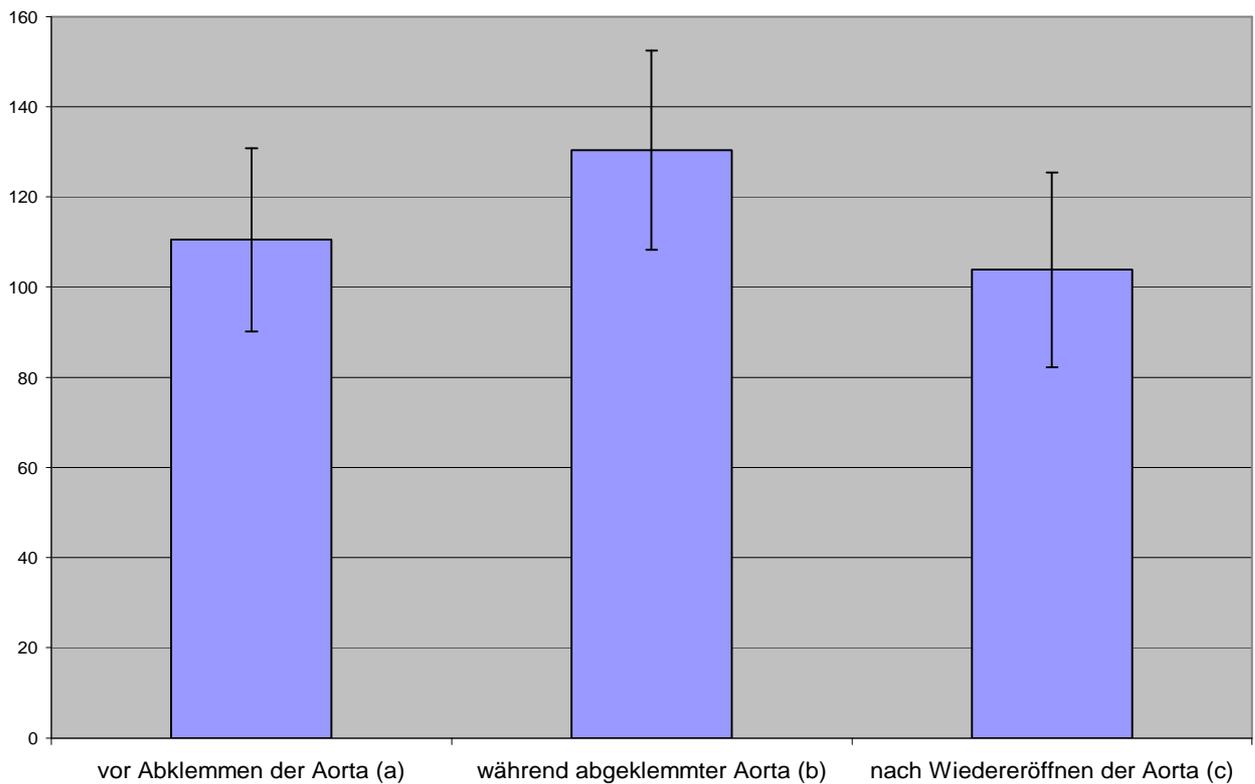


Abbildung 9: Systolischer Blutdruck (mmHg) während verschiedener Operationsphasen

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

	Systolischer Blutdruck (alle Tiere zusammengefasst)		
	vor Abklemmen der Aorta (a)	während abgeklemmter Aorta (b)	nach Wiedereröffnen der Aorta (c)
Mittelwert	110,48	130,39	103,83
SD	20,37	22,04	21,63
p	b	a,c	b
n	9	9	8

Tabelle 5: Systolischer Blutdruck (mmHg)

SD: Standardabweichung; n: Anzahl der Tiere; p: Unterschied signifikant zu
a: vor Abklemmen der Aorta; b: während abgeklemmter Aorta; c: nach Wiedereröffnen der Aorta

b) linksatrialer Druck:

Wie bereits erwähnt, wird der Durchmesser des aorto-kardialen Shunts so gewählt, dass der linksatriale Druck Werte von 12 mmHg nicht überschreitet. Durch Einschnürung des Shunts mit Hilfe von nichtresorbierbarem chirurgischem Nahtmaterial kann der Durchmesser verkleinert und damit die Durchflussrate durch den Shunt vermindert werden. Bei drei Tieren ist eine solche Veränderung des Shuntdurchmessers aufgrund eines zu hohen linksatrialen Druckes notwendig. Die Druckwerte der übrigen fünf Tiere liegen zwischen 8 und 12 mmHg. Die Messung des linksatrialen Druckes mit Pulmonalkatheter (als Wedge Druck) gelingt nur bedingt. Lediglich bei zwei Tieren können verlässliche Werte ermittelt werden (PCW-Mitteldruck bei einem Tier 10 mmHg, bei einem anderen Tier 9 mmHg). Deshalb wird die Messung bei den übrigen Tieren direkt durch Einführen einer über ein flüssigkeitsgefülltes Kathetersystem mit einer Blutdruckmesseinheit verbundenen Kanüle in den linken Vorhof durchgeführt. Auf diese Weise gelingt die Messung ohne weitere Schwierigkeiten.

c) Herzfrequenz:

Der Mittelwert der Herzfrequenzen liegt vor Abklemmen der Aorta bei 104,29/min ($\pm 10,90$). Er verändert sich während der Zeit, in der die Aorta abgeklemmt ist, nur geringgradig auf 102,06/min ($\pm 10,89$) und liegt nach Wiedereröffnen der Aorta bei 100,48/min ($\pm 11,43$) (Abb. 10; Tab.6).

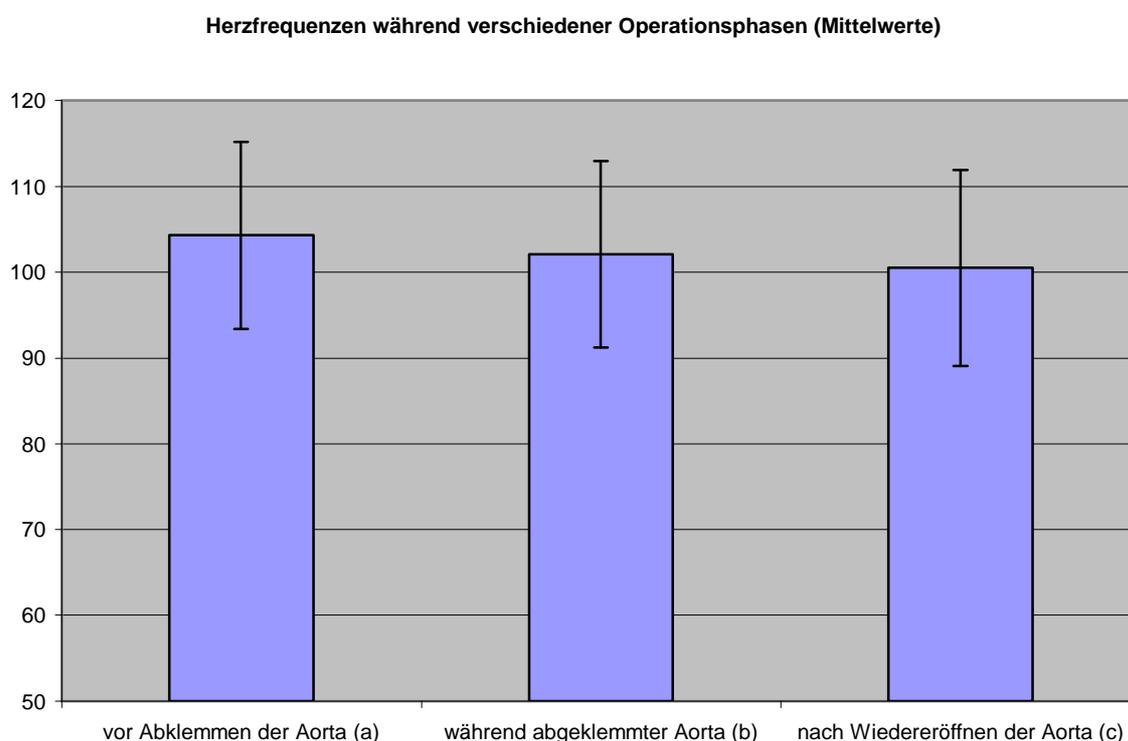


Abbildung 10: Herzfrequenzen (1/min) während verschiedener Operationsphasen

	Herzfrequenzen (alle Tiere zusammengefasst)		
	vor Abklemmen der Aorta (a)	während abgeklemmter Aorta (b)	nach Wiedereröffnen der Aorta (c)
Mittelwert	104,29	102,06	100,48
SD	10,90	10,89	11,43
p	-	-	-
n	9	9	8

Tabelle 6: Herzfrequenzen (1/min)

SD: Standardabweichung; n: Anzahl der Tiere; p: Unterschied signifikant zu

a: vor Abklemmen der Aorta; während abgeklemmter Aorta; nach Wiedereröffnen der Aorta

3.3.3 Fluss durch den aorto-aortalen Shunt

Die distal des Shunts gemessenen Blutdruckwerte liegen bei allen Tieren über 70/30 mmHg. Postoperativ zeigt keines der Tiere neurologische Ausfälle wie beispielsweise Anzeichen einer Lähmung in der Hinterhand. Beeinträchtigungen der Harnblasen- oder Magen-Darm-Funktion werden ebenfalls nicht beobachtet.

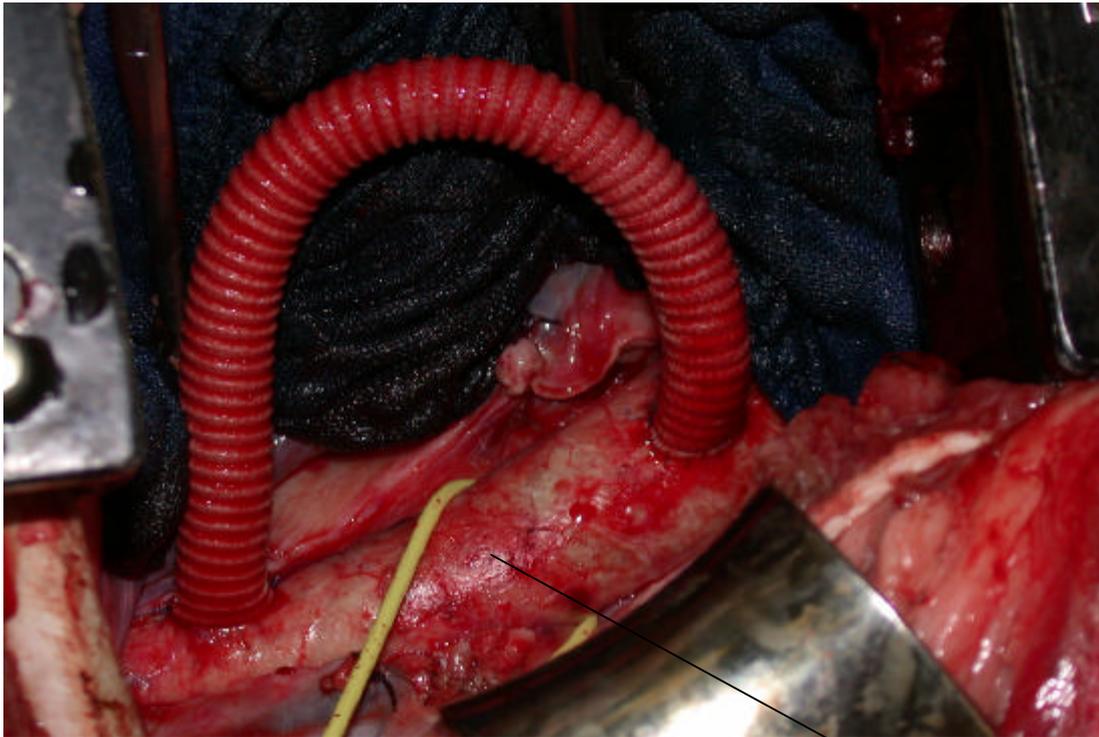


Abbildung 11: Der aorto-aortale Shunt in vivo

Aorta

3.3.4 Funktionalität des aorto-kardialen Shunts

Bei der Palpation des aorto-kardialen Shunts sowohl am Tag der Implantation als auch am Tag der Explantation ist stets ein „Schwirren“ des Gefäßes zu spüren. Die dopplersonographische Untersuchung (Abb. 12) bestätigt den palpatorischen Befund eines funktionierenden Blutflusses durch den Shunt.

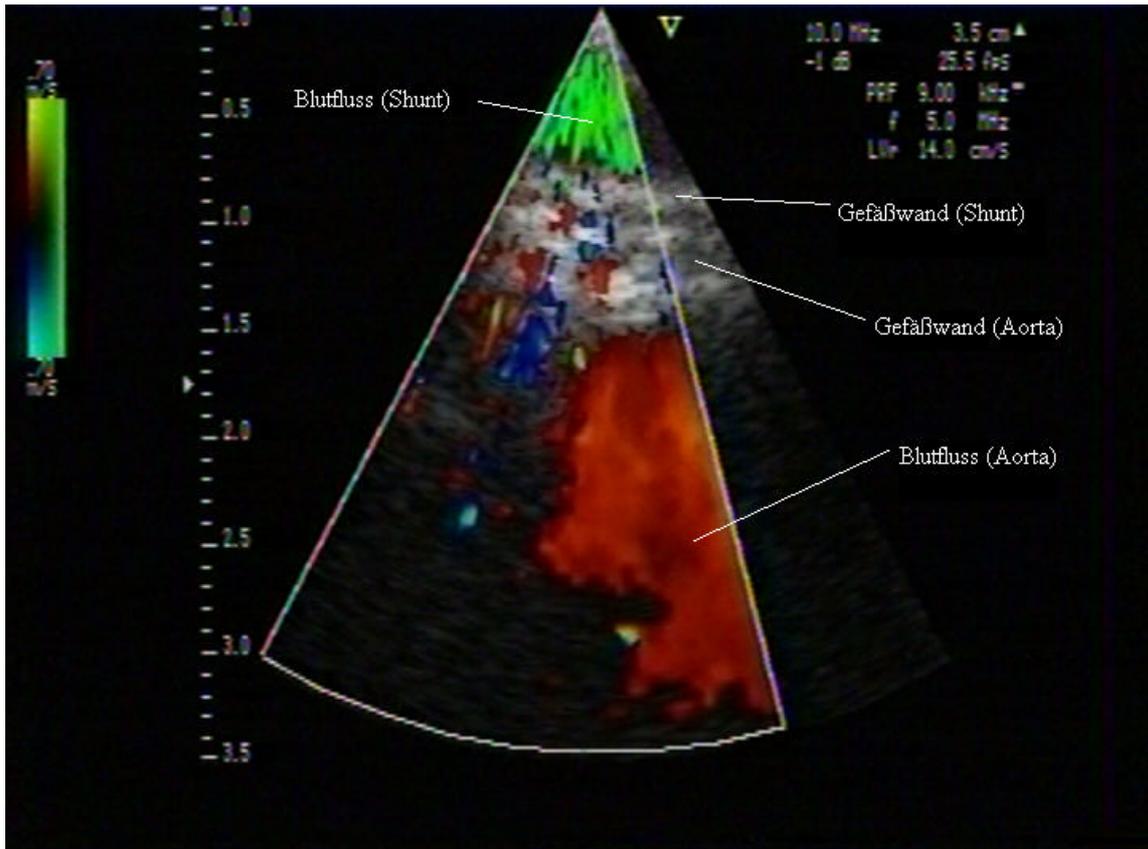


Abbildung 12: Echokardiographische Darstellung des aorto-kardialen Shunts

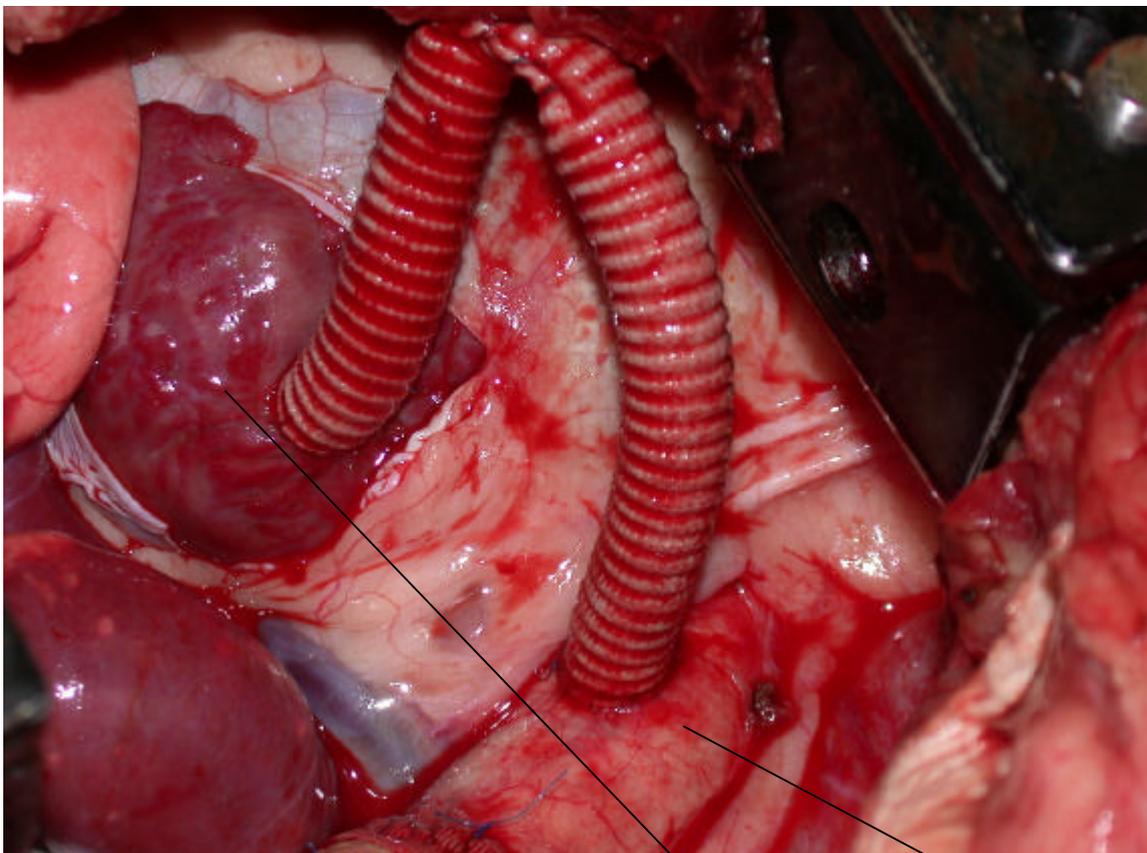


Abbildung 13: Der aorto-kardiale Shunt in vivo

linker Vorhof

Aorta

3.3.5 Echokardiographie der Klappen

Mit Hilfe der Echokardiographie (Abb. 14/ 15) können am Tag 0 bei allen Tieren bis auf Schaf Nr. 253 und Schaf Nr. 684 gute Klappenbewegungen nachgewiesen werden.

Unterbindet man versuchsweise den Blutfluss durch den aorto-kardialen Shunt, so sistieren die Klappenbewegungen.

Schaf Nr. 253 zeigt keine Klappenbewegungen, obwohl sowohl palpatorisch als auch sonographisch ein funktionierender aorto-kardialer Shunt nachgewiesen werden kann.

Bei Schaf Nr. 684 können trotz Veränderung des aorto-kardialen Shuntdurchmessers nur mäßig gute Klappenbewegungen beobachtet werden. Bei diesem Tier ist sonographisch lediglich die Bewegung eines einzelnen Klappensegels darstellbar.

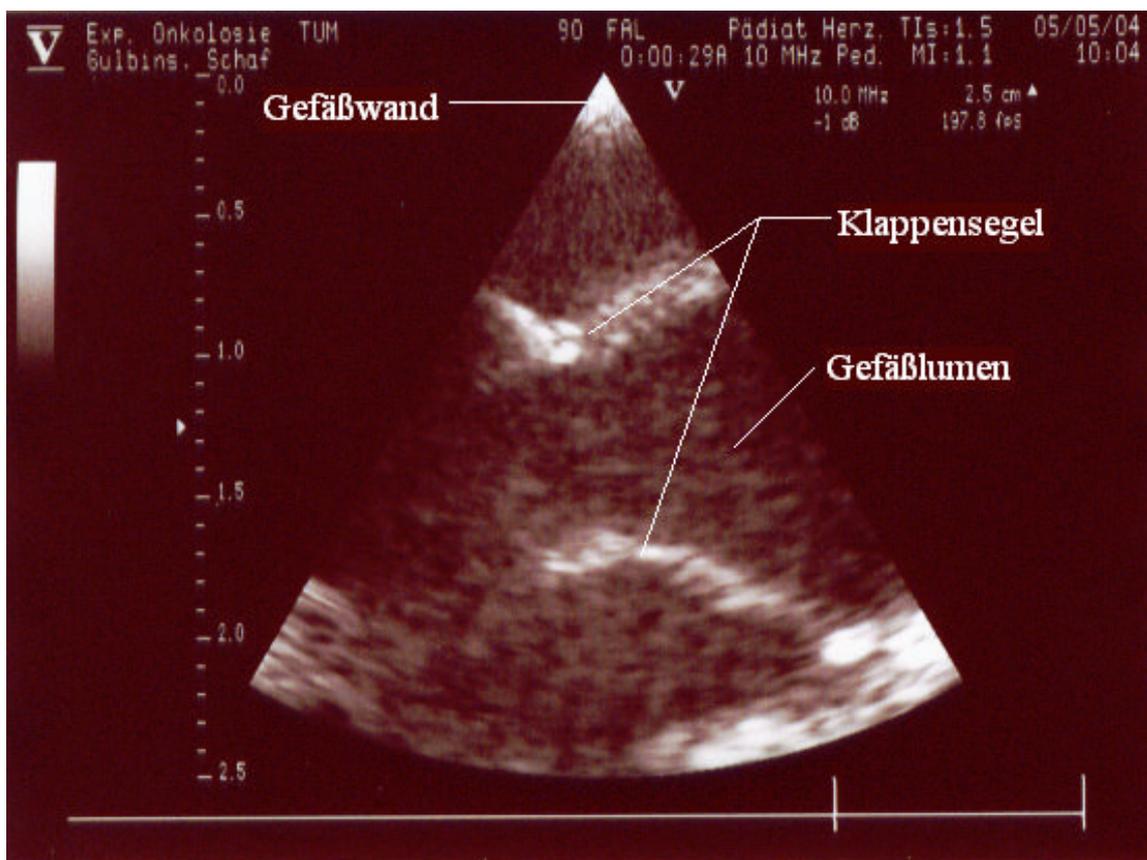


Abbildung 14: Echokardiographische Darstellung der implantierten Klappenprothese

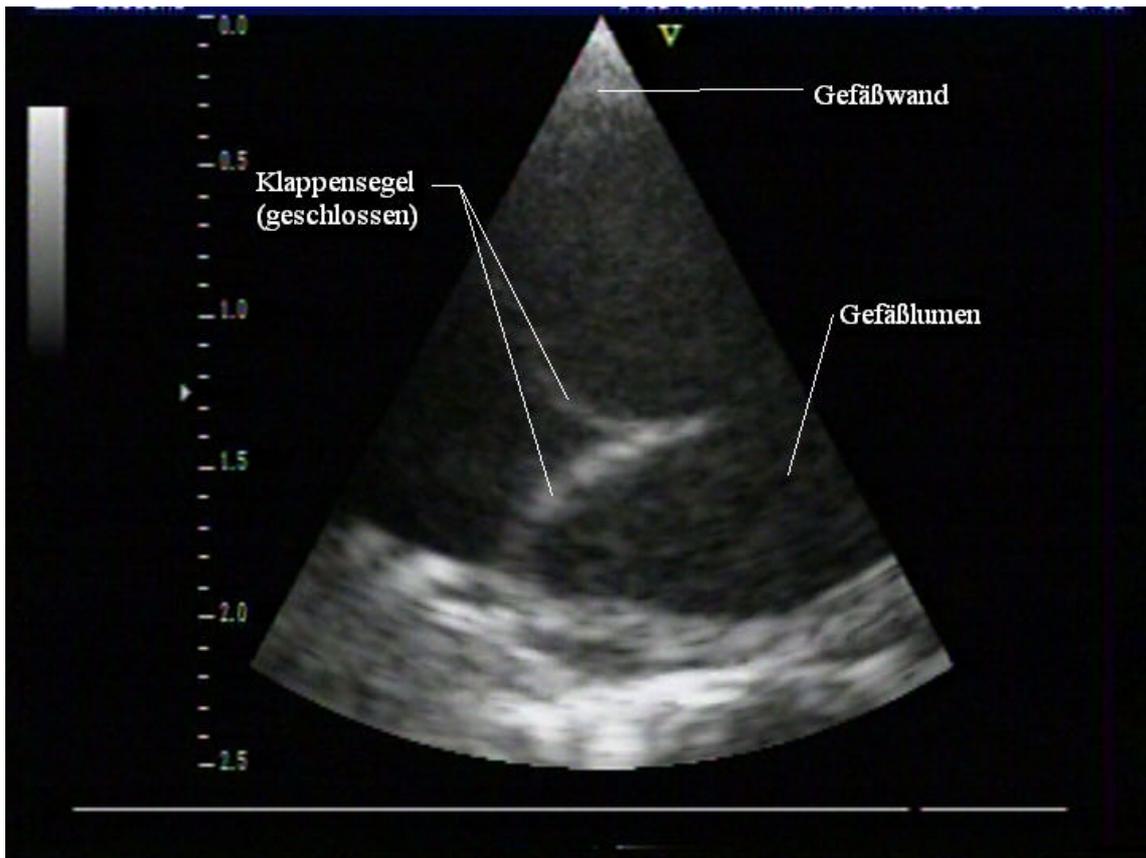


Abbildung 15: Echokardiographische Darstellung der implantierten Klappenprothese

Die Echokardiographie der Klappenprothesen am Tag der Explantation liefert folgende Ergebnisse (siehe auch Tab. 7/ 8):

1. Kontrollgruppe:

Bei einem der beiden Tiere ist im Ultraschall keine Klappenbewegung erkennbar. Bei diesem Tier scheinen die Klappensegel verdickt. Die Klappe des zweiten Tieres zeigt deutliche Segelbewegungen, jedoch diastolisch keinen vollständigen Klappenschluss.

2. Versuchsgruppe:

Bei zwei Tieren ist am Tag der Explantation sonographisch keine Klappenbewegung zu beobachten. In diesen beiden Fällen ist keines der Klappensegel sonographisch lokalisierbar. Bei zwei weiteren Tieren können die Segelbewegungen als mäßig eingestuft werden. Bei diesen Tieren werden im Ultraschallbild geringfügige Exkursionen der Klappensegel beobachtet, jedoch kein diastolischer Klappenschluss. Trotzdem liegen die Klappensegel bei diesen Tieren nicht der Aortenwand an, sondern ragen in das Gefäßlumen. Bei einem Tier zeigen sich gute Bewegungen der Klappensegel mit diastolischem Klappenschluss.

3.3.6 Adspektorische Untersuchung der Lunge am Tag der Klappenexplantation

Am Tag der Explantation können nach Thorakotomie bei allen Tieren folgende Lungenbefunde erhoben werden:

- Die der Adspektion zugängliche Lungenhälfte ist vollständig belüftet
- Es bestehen Verklebungen mit der seitlichen Brustwand

3.3.7 Makroskopische Untersuchung der Klappenprothesen nach dreimonatiger Beobachtungszeit

Die makroskopischen Befunde sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt:

Kontrollgruppe (n=2)		
	Schaf Nr. 125	Schaf Nr. 90
Segelbewegungen im Ultraschall	nein	ja
Thromben	in einem Sinus trunci pulmonalis	in einem Sinus trunci pulmonalis
Retraktion der Segel	ja	ja
zusammenhängendes Endothel	Wand ja, Segel nein	Wand ja, Segel nein
makroskopische Verkalkungen	nein	nein
Besonderheiten	Segel verdickt	

Tabelle 7: Sonographische und makroskopische Beurteilung der Klappe (Kontrollgruppe)

Versuchsgruppe (n=6)						
	Schaf Nr. 204	Schaf Nr. 253	Schaf Nr. 350	Schaf Nr. 394	Schaf Nr. 684	Schaf Nr. 553
Segelbewegungen im Ultraschall	ja	nein	mäßig	mäßig	nein	ja
Thromben	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Retraktion der Segel	nein	ja	ja	ja	nein	ja
zusammenhängendes Endothel	ja	ja	ja	ja	ja	ja
makroskopische Verkalkungen	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Besonderheiten	Echokardiographie bei Implantation; Tier verstirbt einen Tag post operationem	Klappensegel vollständig degeneriert			Klappe luminal mit sulzigem Überzug	

Tabelle 8: Sonographische und makroskopische Beurteilung der Klappe (Versuchsgruppe)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die drei Klappen, welche im Ultraschall keinerlei Bewegung zeigen, unterscheiden sich makroskopisch deutlich voneinander. Die Klappensegel der Schafe Nr. 125 (Kontrollgruppe) und Nr. 253 wirken verdickt, degeneriert und sklerosiert, während die Klappensegel von Schaf Nr. 684 makroskopisch kaum Veränderungen im Vergleich zum Implantationszustand zeigten. Auffällig hierbei ist jedoch, dass die Klappe luminal mit einem sulzigen Überzug bedeckt ist. Erst nach dessen Entfernung werden die Klappensegel sichtbar.

Makroskopisch findet sich bei allen Tieren der Versuchsgruppe ein zusammenhängendes Endothel, welches sowohl Klappensegel als auch Klappenwand auskleidet (Abb. 16). Die Tiere der Kontrollgruppe zeigen makroskopisch keine Anzeichen eines Endothels auf den Klappensegeln, jedoch lässt sich bei diesen Tieren die Ausbildung eines Endothels (Neointima) an den Randzonen der Klappenwand (Übergang Prothese-Aorta) erkennen.

Eine Anbildung von Thromben ist bei beiden Tieren der Kontrollgruppe zu vermerken. Die Thromben befinden sich jeweils in einem Sinus trunci pulmonalis auf nicht endothelialisierter Unterlage.

Bezüglich der Retraktion der Klappensegel gibt es keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe. Lediglich Schaf Nr. 684 (auffälliger luminaler Überzug, s.o.) und Schaf Nr. 204 (Explantation am Tag nach Implantation) zeigen keine Segelretraktion.

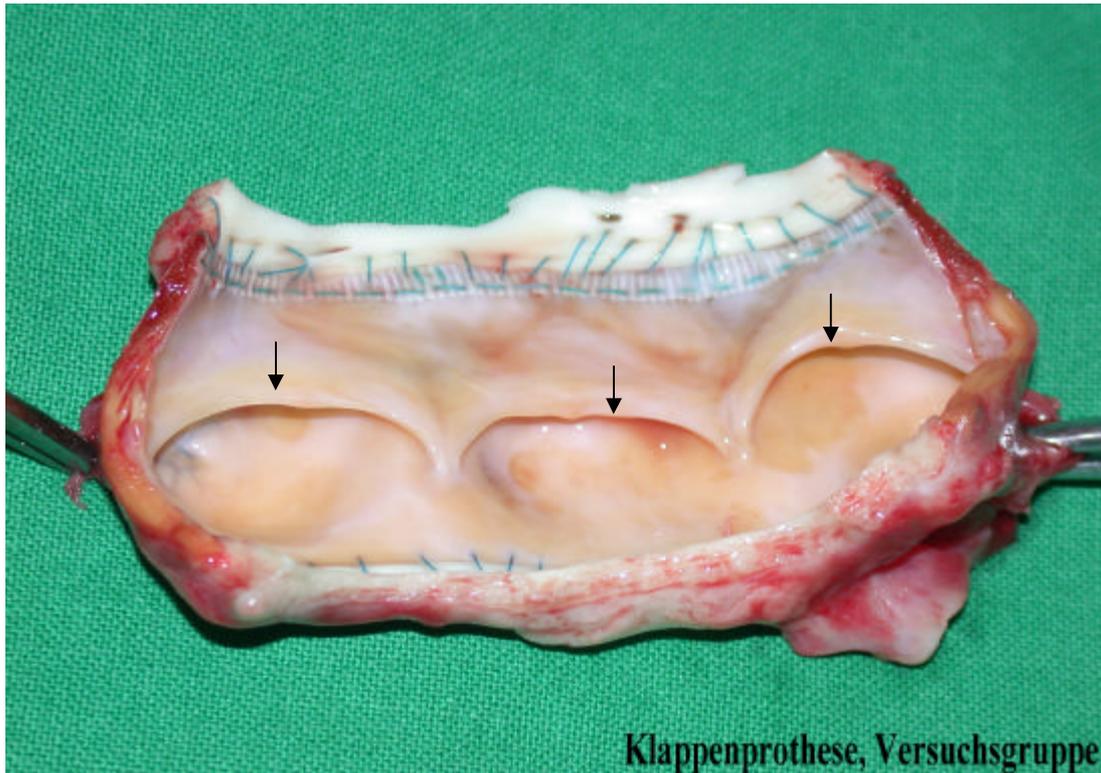


Abbildung 16: Die explantierte Klappenprothese (Versuchsgruppe), Segel (Pfeile) retrahiert, keine Thromben

3.3.4 Mikroskopische Befunde

3.3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Klappenprothesen der Kontrollgruppe zeigt eine nicht endothelialisierte, mit zahlreichen Thromben besetzte faserige Oberfläche (Abb. 17/ 18). Betrachtet man die Randzonen der Prothese, so findet man einen Bereich, in dem diese faserige Oberfläche abrupt in eine glatte endothelialisierte Oberfläche übergeht. Hierbei handelt es sich um Neointima, welche von dem an die Prothese angrenzenden Aortenwandendothel ausgeht (Abb19/ 20).

Die Betrachtung der Klappenprothesen der Versuchsgruppe (Abb. 21) zeigt im Vergleich eine deutlich glattere, „pflastersteinartige“ Oberfläche als Hinweis für ein konfluentes Endothel. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe finden sich hier keine Thromben; durch die dichte Endothelzellschicht können die Klappenfasern nicht mehr erkannt werden.

Abbildung 22 zeigt einen Ausschnitt einer Klappenprothese der Versuchsgruppe vor Implantation. Auch hier lässt sich eine konfluente Endothelzellschicht erkennen.

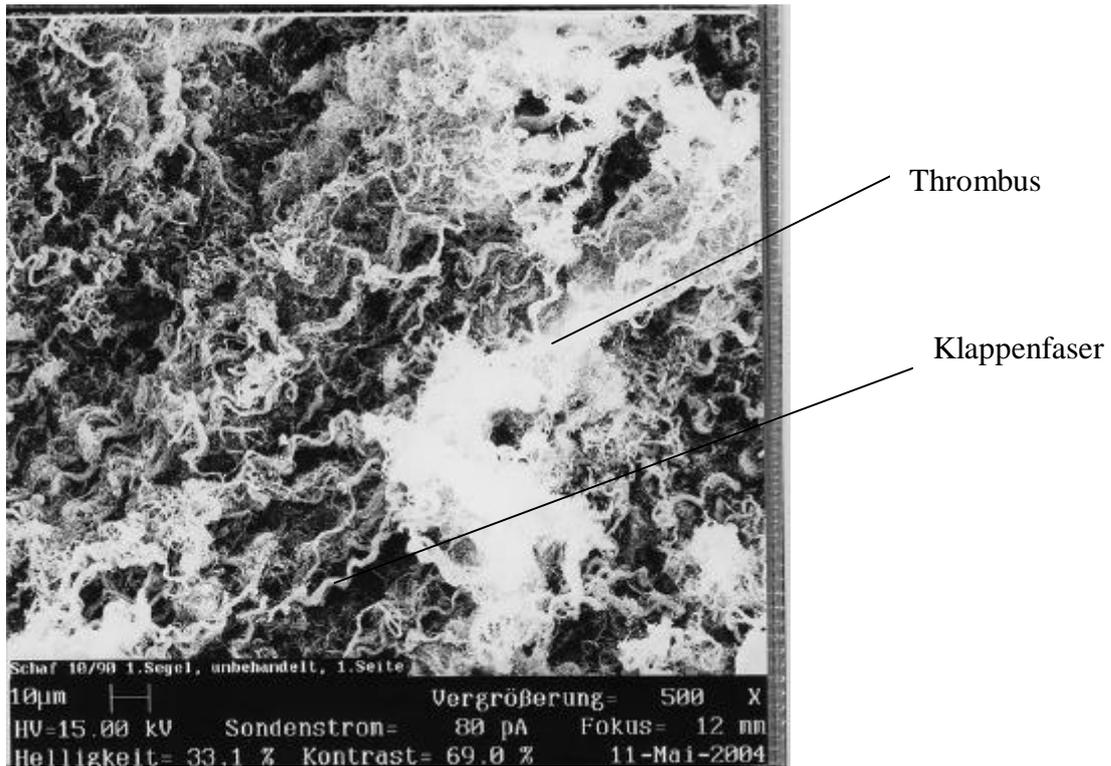


Abbildung 17: Thrombus auf nicht endothelialisierter Unterlage; drei Monate nach Implantation, 500x (Kontrollgruppe)

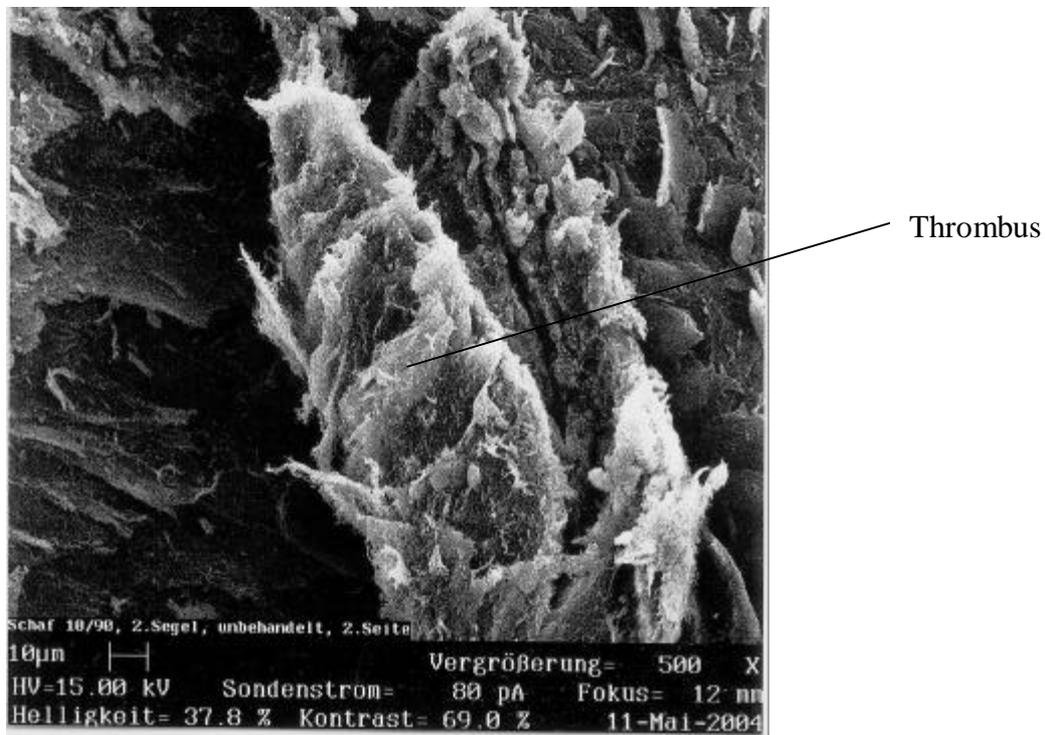


Abbildung 18: Thrombus auf nicht endothelialisierter Unterlage; drei Monate nach Implantation, 500x (Kontrollgruppe)

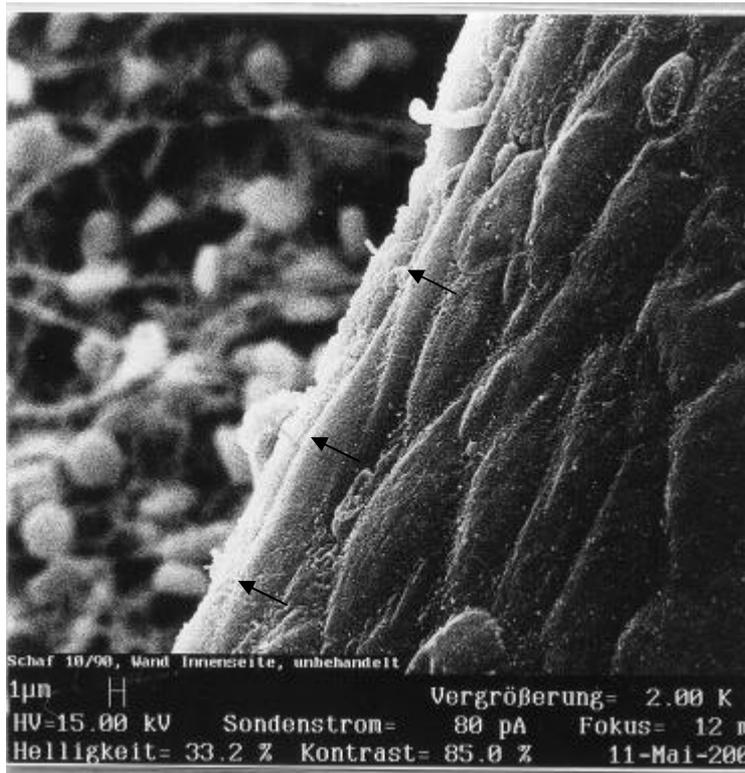


Abbildung 19: Übergang der Neointima auf nicht mit Zellen besiedelten Teil der Klappe; drei Monate nach Implantation, 2000x (Kontrollgruppe)

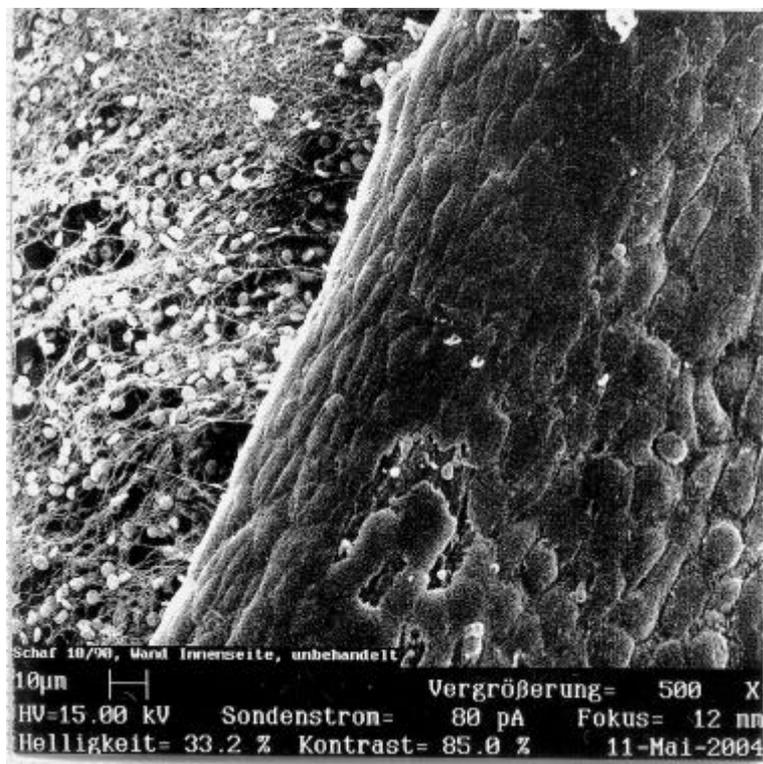


Abbildung 20: Übergang der Neointima auf nicht mit Zellen besiedelten Teil der Klappe; drei Monate nach Implantation, 500x (Kontrollgruppe)

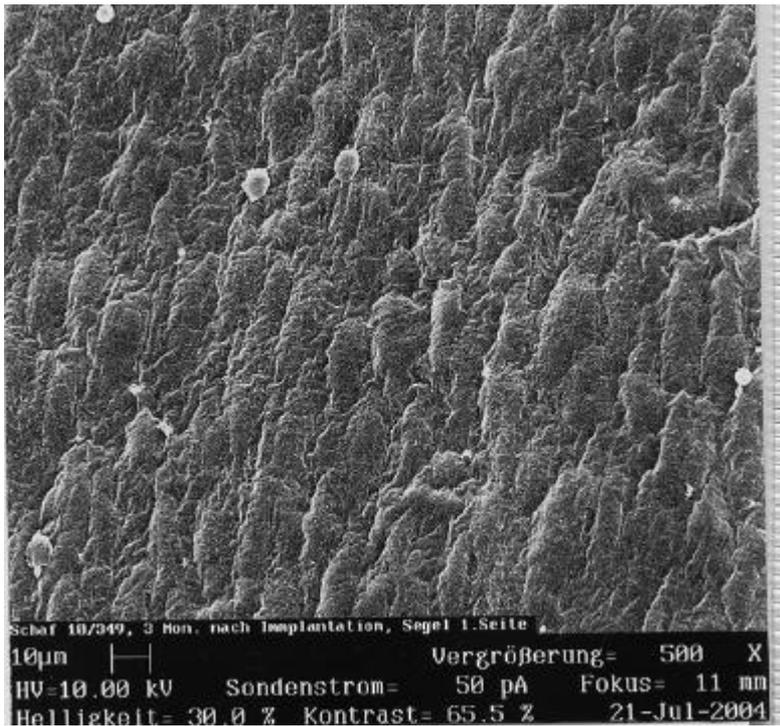


Abbildung 21: Segel drei Monate nach Implantation, 500x (Versuchsgruppe)

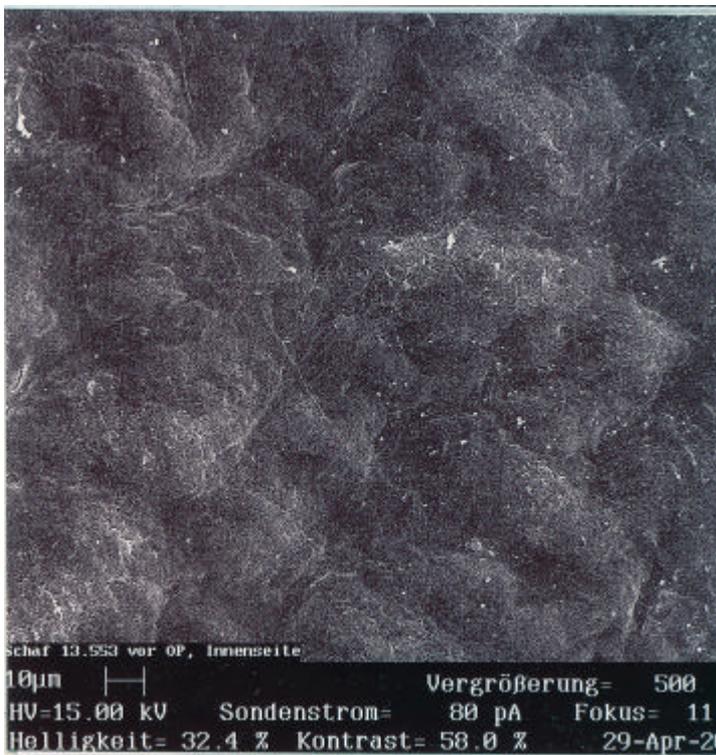


Abbildung 22: Segel vor der Implantation, 500x (Versuchsgruppe)

3.3.4.2 Lichtmikroskopie (Immunhistochemie)

Die Immunhistochemie zeigt bei allen Tieren der Versuchsgruppe sowohl an der Oberfläche der Prothesenwand als auch an den Oberflächen der Segel einen zusammenhängenden roten/rotbraunen Saum (Abb. 23/ 24). Dieser Nachweis von Faktor VIII beweist das Vorhandensein von vitalen Endothelzellen.

In Abbildung 24 lassen sich außerdem positiv gefärbte Endothelzellen in der Wand erkennen. Diese Beobachtung konnte bei einem Tier gemacht werden. Es handelt sich hierbei um Gefäßeinsprossungen als Hinweis auf eine Entzündungsreaktion.

Abbildung 23 zeigt einen Klappensegelausschnitt desjenigen Schafes, welches einen Tag nach Klappenimplantation verstarb. Die histologische Untersuchung der Klappe gibt keinen Hinweis auf die Todesursache.

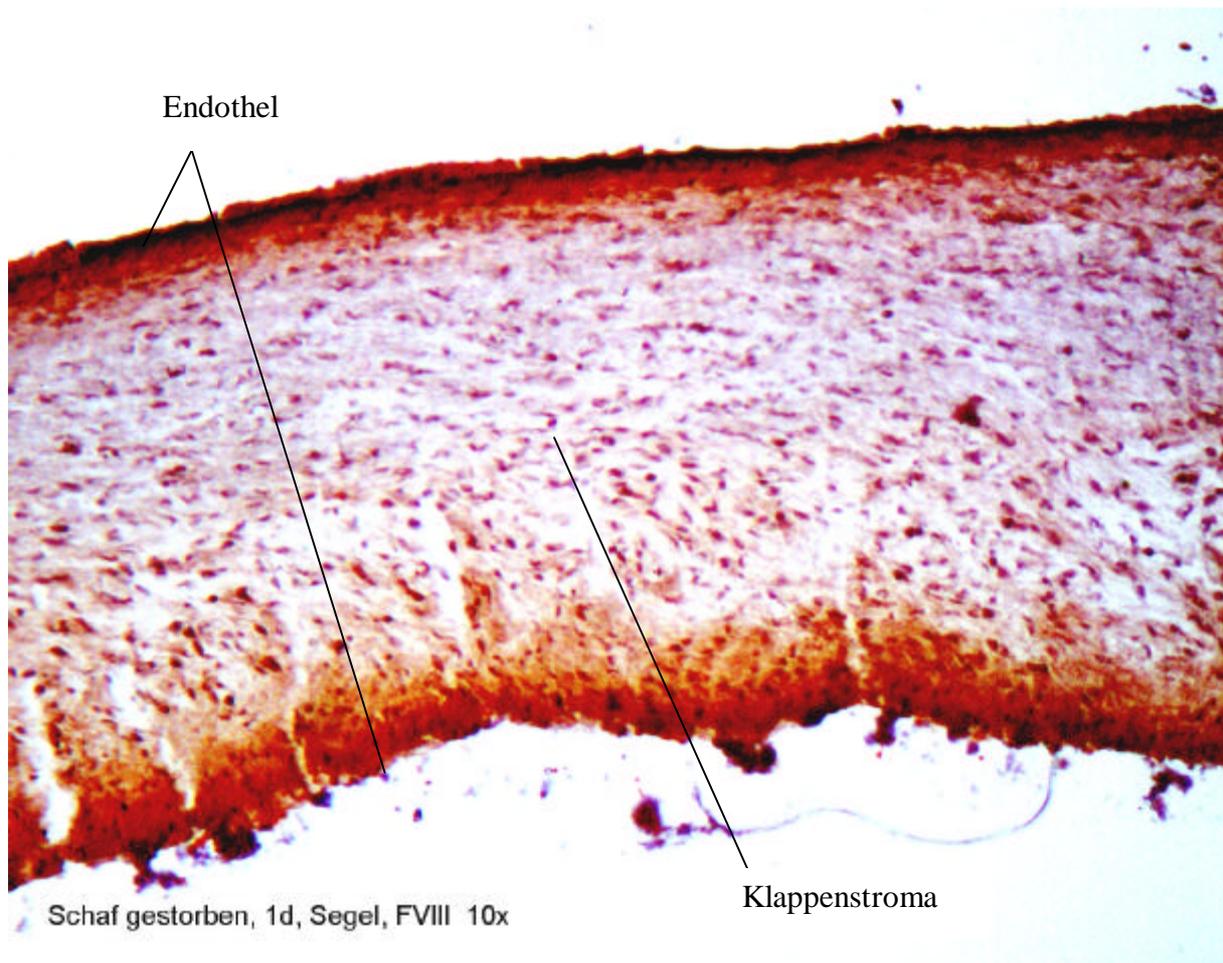


Abbildung 23: Faktor VIII- + Hämalaun-Färbung Segel; 1 Tag nach Implantation, 10x (Versuchsgruppe)

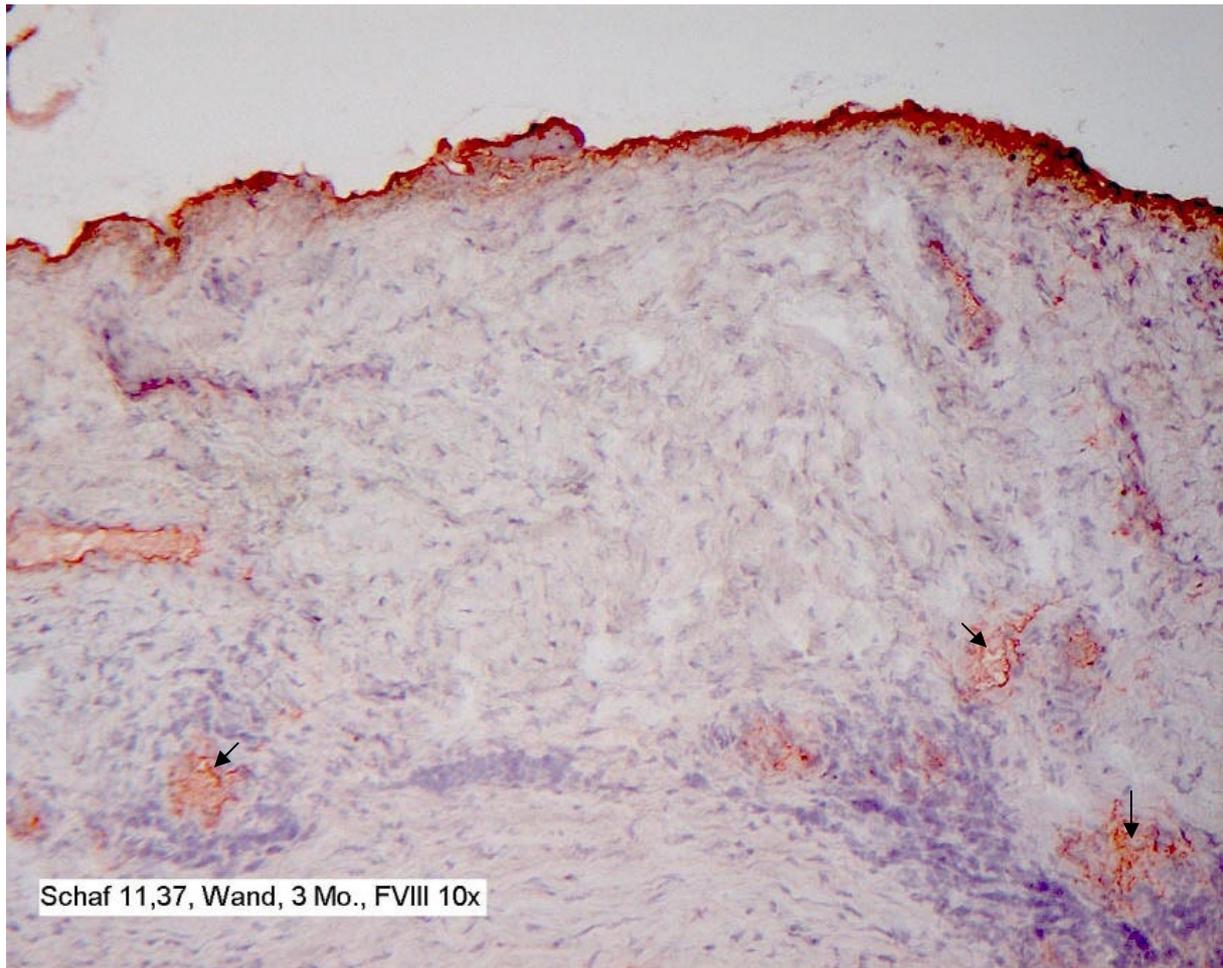


Abbildung 24: Faktor VIII+ Hämalaun-Färbung Wand; Gefäßeinsprossung (?); drei Monate nach Implantation, 10x (Versuchsgruppe)

3.3.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Bei allen Tieren der Versuchsgruppe kann auf der Oberfläche von Klappenwand und Klappensegeln eine rote Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 25). Diese beweist das Vorhandensein von initial auf die Klappen aufgetragenen Endothelzellen.

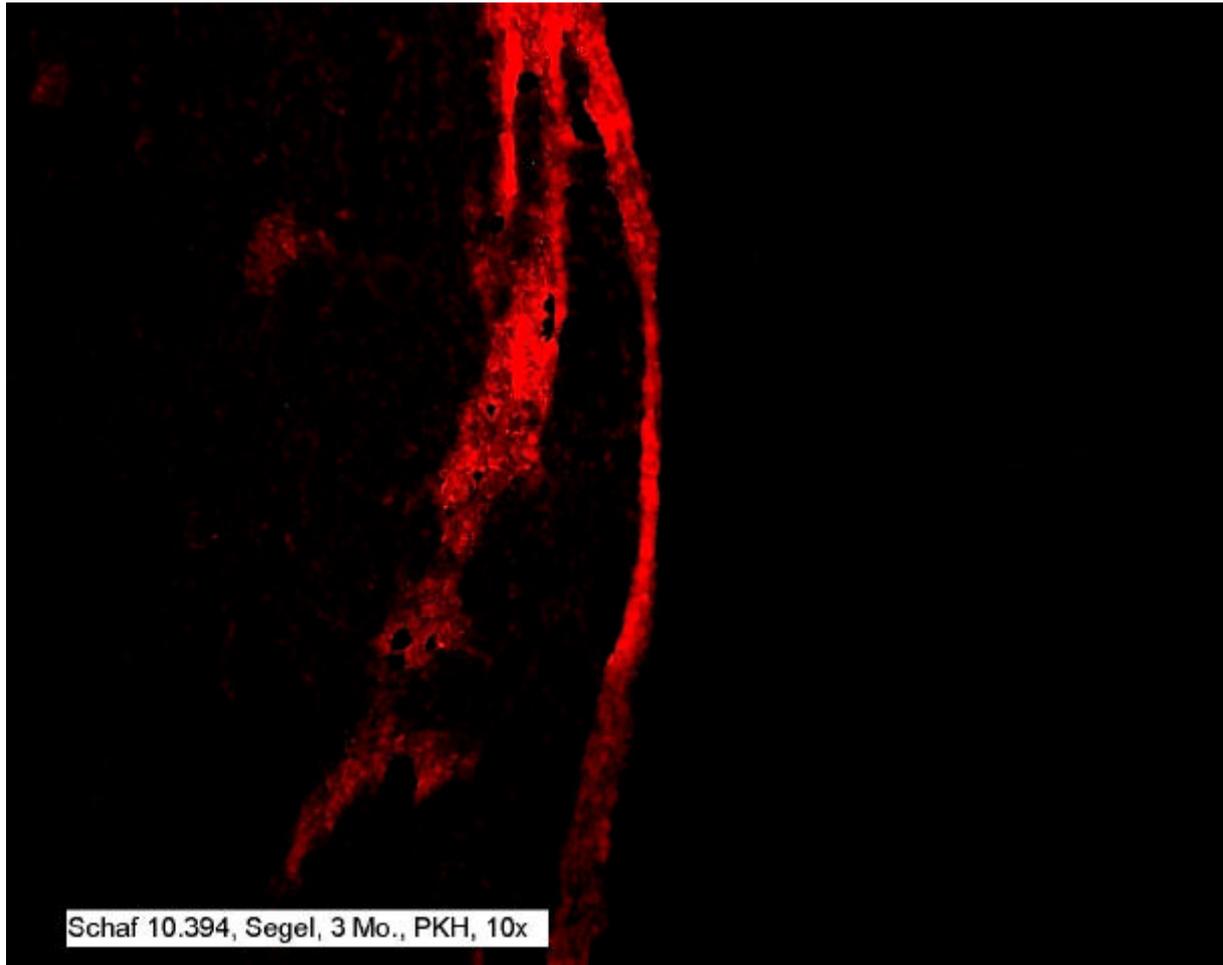


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopie; drei Monate nach Implantation, 10x (Versuchsgruppe)

4 DISKUSSION

4.1 Verwendetes Tiermodell – mögliche Narkoseschwierigkeiten

Das Schaf erweist sich in dieser experimentellen Studie als geeignetes Modell für die Herzklappenimplantation. Allerdings birgt die Allgemeinanästhesie des kleinen Wiederkäuers einige beachtenswerte Risiken: obwohl die Tiere 36 Stunden vor Narkoseeinleitung kein Futter mehr zu sich nehmen, kommt es aufgrund der komplexen Physiologie des Wiederkäuermagens nicht zu einer vollständigen Magenentleerung. Daraus resultiert eine erhöhte Aspirationsgefahr von Mageninhalt, sollte es (v.a. im Einschlaf- und Aufwachstadium) zu einer Regurgitation kommen. Selbst eine längere Fastendauer - beispielsweise von 48 Stunden - kann dieses Risiko nicht ganz eliminieren, da sie nicht zu einer vollständigen Entleerung des Pansens führt; es kommt lediglich zu einer anteilmäßigen Verminderung der flüssigen Phase des Panseninhaltes. Passive Mechanismen führen auch während tiefer Narkose (Ösophagus erschlafft) zu gastroösophagealem Reflux (HOSSAIN et al. 1988b), jedoch kann in diesem Narkosestadium die Aspirationsgefahr durch endotracheale Intubation, Legen einer Magen-Schlund-Sonde und sorgfältige Lagerung des Tieres deutlich vermindert werden. HOSSAIN et al. (1988a) fanden heraus, dass ein leichtes Hochlagern des Kopfes die Refluxhäufigkeit senkt.

Eng mit der Aspirationsproblematik verbunden ist die Frage nach der Intubation der Tiere. Da die Epiglottis der Schafe - beispielsweise im Vergleich zum Hund - sehr weit kaudal liegt, besteht die Gefahr, dass der Cuff des Tubus durch eine Lageveränderung genau auf Höhe der Epiglottis oder sogar kranial davon zu liegen kommt und somit der Zugang zur Trachea nicht mehr sicher abgedichtet ist. Kommt es zu einer solchen Kranialverlagerung des Tubus, so besteht die Gefahr, dass durch den Druck des Cuffs auf die Epiglottis ein Würgereiz ausgelöst wird, welcher unter Umständen zum Regurgitieren von Mageninhalt mit anschließender Aspiration führt.

In der vorliegenden Studie verstirbt ein Tier während der Aufwachphase nach Aspiration von Mageninhalt. Da das Tier zu dieser Zeit noch intubiert und der Cuff intakt ist, scheint der gerade beschriebene Hergang als Erklärung denkbar.

Da es während der Narkose von Schafen zur Inhibition von zerebralen Reflexzentren kommt, welche für die Pansenkontraktionen verantwortlich sind (LEEK 1983), besteht bei

DISKUSSION

Durchführung einer Allgemeinanästhesie bei dieser Tierart außerdem die Gefahr einer durch diese Pansenatonie hervorgerufenen Tympanie. Durch Einführen einer Magen-Schlund-Sonde kann dieser Gefahr zwar vorgebeugt werden, allerdings kommt es bei Verwendung einer Magenschlundsonde gehäuft zu gastroösophagealem Reflux (HOSSAIN et al. 1988a). Die vergleichsweise starke Salivation der Tiere während der Narkose birgt aufgrund des damit verbundenen Verlusts von Bikarbonat die Gefahr einer Azidose. Regelmäßige Blutgaskontrollen sind Grundlage für eine rechtzeitige Korrektur des Säure-Basen-Status.

Das Phänomen des pulmonalen Shuntens ist ein besonders bei Kälbern (AOUAD et al. 1981) und Schafen relativ häufig beschriebener Narkosezwischenfall. Hierbei kommt es zu einer Konstriktion der kleinen Lungengefäße und einem „Vorbeifließen“ (über Anastomosen) des nichtoxygenierten Blutes an der Lunge. Folglich sinkt die Sauerstoffsättigung ab. Es handelt sich bei diesem Phänomen scheinbar um einen Spasmus der glatten Muskulatur der kleinen Lungenarterien. Besonders bei lungengeschädigten Wiederkäuern stellt die Shuntung des nichtoxygenierten Blutes ein erhebliches Narkoserisiko dar (ERHARDT et al. 1985). Um einem dramatischen Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks entgegenzuwirken, sollte prophylaktisch vor Narkoseeinleitung in jedem Fall eine Präoxygenierung der Tiere und nach Einleitung der Allgemeinnarkose eine sofortige Intubation und Sauerstoffanreicherung der Einatemungsluft erfolgen (ERHARDT et al. 1985). Die Ergebnisse der Pulsoximetrie zeigen, dass in den vorliegenden Versuchen pulmonales Shuntens nicht bzw. nicht in messbarem Ausmaß stattgefunden hat.

Trotz der Probleme, welche bei der Allgemeinanästhesie des Schafes zu bewältigen sind, liegt der große Vorteil dieser Tierart in der guten Vergleichbarkeit mit dem Menschen: Herzgröße, Herzfrequenz, Schlagvolumen und intrakardiale Drücke sind denen des Menschen ähnlich (HERIJGERS et al. 1999). Des Weiteren sind Schafe für die hier durchzuführenden Untersuchungen besonders geeignet, da sich bei ihnen –und hier im Besonderen bei jungen, wachsenden Schafen- Klappenveränderungen, welche beim Menschen erst mehrere Jahre nach Klappenimplantation zu erwarten sind, schon einige Monate nach Implantation zeigen (BARNHART et al. 1982).

4.2 Diskussion des heterotopen Klappenmodells

Auf der Suche nach einem technisch vergleichsweise einfachen Klappenmodell für die Durchführung von Versuchen zum Herzklappenersatz bietet sich die heterotope Implantation der Klappe an. Frühere Versuche haben gezeigt, dass speziell auf dem Gebiet des Tissue Engineerings Ergebnisse, welche für die Besiedlung von Pulmonalklappen gelten, nicht ohne weiteres auf die Aortenklappe übertragbar sind (SCHENKE-LAYLAND et al. 2003). Für eine Versuchsanordnung, welche die mechanische Beanspruchung im Hochdruckgebiet so gut wie möglich simulieren soll, kommt deshalb nur eine orthotope (technisch aufwendig, extrakorporale Zirkulation ist Voraussetzung) oder heterotope Implantation der Klappe in die Aorta in Frage.

Aufgrund der hohen Mortalitätsrate in vergleichbaren Studien (ALI et al. 1996; GOTT et al. 1997; HERIJGERS et al. 1999) ist es das Ziel der vorliegenden Untersuchung, ein vergleichsweise einfaches Modell zu etablieren. So werden die Klappen unter Verzicht auf eine extrakorporale Zirkulation heterotop in die Aorta implantiert. Acht der neun Tiere (89%) überleben die Operation, sieben Tiere (78%) überleben die dreimonatige Beobachtungszeit ohne jegliche Komplikation. Damit liegt die Überlebensrate deutlich über dem Durchschnitt (<50%) vergleichbarer Studien (HERIJGERS et al. 1999).

Die Implantation der Klappe in heterotoper Position in der Aorta bringt vor allem zwei Schwierigkeiten mit sich:

1. Simulation eines diastolischen Klappenschlusses
2. Verhinderung einer Rückenmarksischämie während der aortalen Klappenimplantation

zu 1. Simulation eines diastolischen Klappenschlusses:

Physiologischerweise kommt es am Herzen zu einem Schluss der Aortenklappe, sobald der linksventrikuläre Druck den Aortendruck am Ende der Austreibungsphase unterschreitet (KLINKE und SILBERNAGL 1994). Dieser Mechanismus greift jedoch bei heterotop in der Aorta implantierten Herzklappen bei gleichzeitigem Erhalt der tiereigenen Aortenklappen in orthotoper Position nicht mehr. Durch den Druckunterschied zwischen Ventrikel und Aorta kommt es zwar weiterhin zu einem diastolischen Klappenschluss der tiereigenen Aortenklappe, der relative Unterdruck

DISKUSSION

des Ventrikels ist jedoch daraufhin im Hinblick auf einen Schluss der nachgeschalteten Klappenprothese nicht mehr wirksam. Vielmehr kommt es durch die Windkesselfunktion der Aorta zu einem vorwärtsgerichteten Blutstrom, welcher die heterotop implantierte Aortenklappe während des gesamten Herzzyklus offen hält.

Dieses Problem kann in der vorliegenden Arbeit durch Anlage eines aorto-kardialen Shunts gelöst werden. Da der linksatriale Druck (Abb. 26) stets niedriger ist als der Aortendruck (KLINKE und SILBERNAGL 1994), führt die Anlage eines Shunts zwischen Aorta und linkem Vorhof stets zu einem kardial gerichteten Blutfluss. Legt man den Shuntabgang direkt proximal der implantierten Klappe an, schafft man proximal der implantierten Klappe diastolisch einen relativen Unterdruck. Daraus resultiert im günstigsten Fall ein diastolischer Klappenschluss, zumindest aber eine diastolische Segelbewegung. Eine temporäre Unterbindung des Blutflusses durch den Shunt führt in den vorliegenden Versuchen zu einem echokardiographisch nachweisbaren Sistieren der Segelbewegungen und belegt damit die Wirksamkeit des angelegten Shunts.

Ungeachtet dieser Überlegungen kann bei einem Tier unmittelbar nach Klappenimplantation keine Segelbewegung erreicht werden, bei einem anderen Tier lassen sich sonographisch lediglich die Bewegungen eines einzelnen Segels darstellen. Die Ursache hierfür kann nicht mit Sicherheit gefunden werden. Eine mögliche Ursache wäre, dass bei diesen Tieren -trotz patentem aorto-kardialem Shunt- der Shuntfluss nicht ausreicht, um proximal der implantierten Klappe einen genügend großen Unterdruck aufzubauen. In diesem Fall könnte ein aorto-kardialer Shunt mit größerem Durchmesser Abhilfe schaffen. Bei großen Flussraten durch den Shunt besteht jedoch die Gefahr, dass es durch die resultierende dauerhaft erhöhte Volumenbelastung zu einer Dekompensation des Herzens kommt (ZHANG et al. 1997). Aus diesem Grund wird der Durchmesser der verwendeten Shunts so gewählt, dass der linksatriale Druck Werte von 12 mmHg nicht überschreitet.

Die Messung des linksatrialen Druckes als Wedge-Druck über einen Pulmonalis-katheter bringt in den eigenen Versuchen einige Schwierigkeiten mit sich. Lediglich bei zwei Tieren kann ein glaubwürdiger Wedge-Druck ermittelt werden.

Grund für die nicht zufriedenstellenden Ergebnisse der Druckmessung mit Pulmonalis-katheter ist die Tatsache, dass ein Einschwenken des Katheters in die A. pulmonalis vielfach nicht gelingt. Ob die Ursache hierfür in einigen Fällen darin besteht, dass der Katheter beim Einführen den rechten Vorhof direkt wieder über die

DISKUSSION

V. cava caudalis verlässt, oder ob die verwendeten Katheter zur Messung des pulmonalarteriellen Verschlussdrucks (Wedge-Druck) relativ zu kurz sind (? Blähen des Ballons führt nicht zu vollständigem Verschluss der Pulmonalarterie), wird nicht mit Sicherheit geklärt. Um die Narkosedauer für die Tiere nicht unnötig zu verlängern, verzichtet man auf weitere Einschwemmversuche und führt fortan eine direkte Messung des Vorhofdrucks durch Einführen einer Kanüle in den linken Vorhof durch. Die eingeführte Kanüle ist hierbei durch eine Perfusorleitung mit einer Blutdruckmesseinheit verbunden (Datex-Ohmeda, Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland). Die auf diese Weise ermittelten Werte werden als ausschlaggebendes Kriterium für eine Veränderung des Shuntdurchmessers herangezogen.

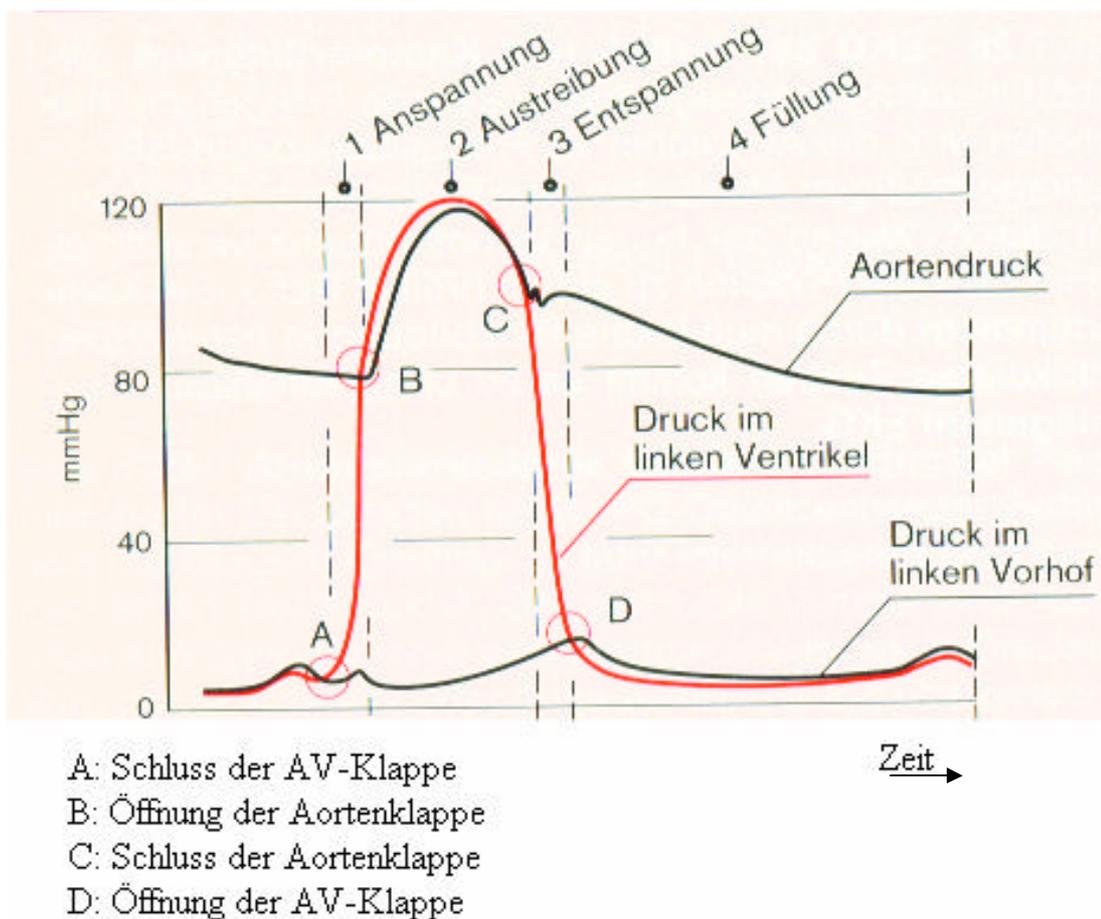


Abbildung 26: Herzzyklus, nach KLINKE und SILBERNAGEL (1994)

Zu 2. Verhinderung einer Rückenmarksischämie während der Klappenimplantation

Für die Dauer der Klappenimplantation muss die Aorta abgeklemmt und die Blutversorgung über eine Gefäßprothese aufrechterhalten werden. Da beim Wiederkäuer die Versorgung des Rückenmarks kaudal des dritten Brustwirbels über Äste der Aa. intercostales dorsales erreicht wird (NICKEL et al. 1992), kann eine Minderperfusion dieser segmental von der Aorta abgehenden Gefäße schwerwiegende Schäden nach sich ziehen. Aus diesem Grund sollte das auszuklemmende Stück der Aorta so gewählt werden, dass in den betroffenen Bereich keine Abgänge von Interkostalarterien fallen. Des Weiteren sollte der Durchmesser der Gefäßprothese ausreichend groß sein, sodass die sie durchfließende Blutmenge den distal der Prothese gemessenen Blutdruck nicht zu weit absinken lässt. Diese beiden Forderungen können bei allen Tieren eingehalten werden. Der distal der Prothese gemessene Blutdruck liegt bei allen Tieren stets über 70/30 mmHg und bei keinem der Tiere ist eine Einbeziehung eines Gefäßabgangs in den ausgeklemmten Aortenbereich notwendig. Eine Querschnittslähmung bzw. Blasen- oder Darmentleerungsstörungen, wie man sie nach schweren ischämischen Traumen des Rückenmarks erwarten würde (LIEBSCH 2001), treten bei keinem der Tiere auf. Auch ansonsten zeigen sich post operationem keinerlei neurologische Ausfälle.

Auffällig ist lediglich bei allen Tieren eine post operationem auftretende Lahmheit der linken Vorderhand, welche jedoch nicht von Schädigungen des Rückenmarks verursacht wird. Vielmehr handelt es sich hierbei um eine Schonhaltung, welche die Tiere aufgrund der schmerzhaften Thorakotomie einnehmen. Die Lahmheit hält bei keinem der Tiere länger als zwei Tage an.

4.3 Diskussion der Versuchsdurchführung

Ein Tier verstirbt ca. 22 Stunden nach Implantation einer beschichteten Klappenprothese. Bei diesem Tier können bereits intra operationem chronische Veränderungen des Lungengewebes (Verklebungen, atelektatische Bezirke) beschrieben werden. Die makroskopische Untersuchung der Lunge post mortem ergibt das bereits während der Operation beschriebene Bild, jedoch mit großflächigeren atelektatischen Bezirken. Es ist anzunehmen, dass als

DISKUSSION

Todesursache eine Lungenkomplikation in der postoperativen Phase vorliegt. Die Adspektion der Lungen der übrigen Tiere zum Zeitpunkt der Klappenexplantation zeigt keine oder nur kleinflächige atelektatische Lungenbezirke.

Eine Studie von IRWIN et al. (1993) belegt eine hohe Prävalenz bereits vorbestehender Pneumonien beim Schaf. Thorakotomie und lange Narkosedauer unter positiver Druckbeatmung können bevorzugt bei Patienten mit bereits vorgeschädigter Lunge zu ausgeprägten Atelektasen oder einer akuten respiratorischen Insuffizienz führen (KUROWSKI und DESENIß 2004).

Mangelhafte Entlüftung des aorto-kardialen Shunts führt bei einem Tier der Kontrollgruppe zu einer massiven Luftembolie. Das dadurch hervorgerufene Kammerflimmern kann durch Defibrillation trotz mehrfacher Versuche nicht dauerhaft behoben werden.

Die kontinuierliche Beobachtung des Kreislaufstatus zeigt bei allen Tieren einen ähnlichen Verlauf. Nach Abklemmen der Aorta kommt es zu einem signifikanten Anstieg des an der Ohrarterie gemessenen Blutdrucks. Der im Vergleich zur Aorta geringere Durchmesser des aorto-aortalen Shunts lässt diese Beobachtung bei gleichbleibender bzw. nicht signifikant veränderter Herzleistung erwarten. Gleichzeitig nimmt der distal des Shunts gemessene Blutdruck niedrigere Werte an. Nach Wiedereröffnung der Aorta sinkt der an der Ohrarterie gemessene Blutdruck wieder ab und nimmt Werte im Bereich der Ausgangsmesswerte an.

Das Absinken des expiratorischen Kohlendioxids ist durch eine Wiederbelüftung der linken Lungenanteile mit erhöhten Volumina erklärbar. Diese Maßnahme wird am Ende der Operation durchgeführt, um die während der Thorakotomie kollabierten Alveolen wieder mit Luft zu füllen und so einer Atelektasebildung vorzubeugen. Bei diesem „Blähen“ der Lunge sollte nicht mit zu großen Atemzugvolumina beatmet werden, da diese zu einem Barotrauma führen können. Ein solches Barotrauma wird für Beatmungsdrücke über 40 mbar beschrieben (SCHÄFER und EBERHARDT 2002).

4.4 Diskussion der Resultate

4.4.1 makroskopische Untersuchung der Klappen

Bei der makroskopischen Untersuchung der explantierten Klappen fällt mit Ausnahme von zwei Tieren stets eine Retraktion der Klappensegel auf. Hierbei handelt es sich um eine beginnende Klappendegeneration. Auch wenn die Klappen noch keine Anzeichen einer Verkalkung zeigen, deutet dieser Befund darauf hin, dass die Endothelzellbeschichtung eine Degeneration nicht verhindern bzw. verzögern konnte. Degenerative Veränderungen von biologischen Klappenprothesen werden in Langzeitstudien beim Menschen vielfach beschrieben (BURR et al. 1995; EDWARDS et al. 1995) und enden häufig in einer mineralisierten und damit nicht mehr funktionstüchtigen Prothese. Dabei hängt das Ausmaß der Klappendegeneration offensichtlich von der Implantationsstelle ab: Mitralklappenersatz zeigt in einer Langzeitstudie von EDWARDS et al. (1995) eine höhere Inzidenz an degenerativen Prozessen als Aortenklappenersatz. Als Grund für diese Beobachtung vermuten die Wissenschaftler die an der Mitralklappe herrschenden höheren Verschlussdrücke.

In den eigenen Versuchen zeigt sich, dass eine Degeneration offensichtlich nur dann auftritt, wenn die Klappen der mechanischen Beanspruchung eines dauerhaften Blutstroms ausgesetzt sind; eine Aussage über die Abhängigkeit zwischen Ausmaß der Degeneration und Verschlussdruck kann jedoch nicht gemacht werden, da hinsichtlich des Verschlussdrucks keine Messwerte vorliegen. Eine Degeneration wird nur in zwei Fällen nicht gefunden. Hierbei handelt es sich zum einen um das einen Tag post operationem verstorbene Schaf – aufgrund der kurzen Implantationsdauer ist hier keine Klappendegeneration zu erwarten - zum anderen um ein Schaf, bei dem bereits während der sonographischen Untersuchung die Klappensegel der Aorta bewegungslos anliegen. Bei diesem Schaf sind die Segel luminal von einem entzündlich wirkenden, sulzigen Überzug bedeckt. Da schon zum Zeitpunkt der Klappenimplantation lediglich die Bewegung eines Segels nachgewiesen werden kann, ist anzunehmen, dass auch die Klappe dieses Tieres während der dreimonatigen Implantationsdauer eine deutlich geringere mechanische Beanspruchung erfahren hat, als die übrigen.

4.4.2 mikroskopische Untersuchung der Klappen

Obwohl nach biologischem Klappenersatz für den Großteil der Patienten eine Antikoagulationstherapie nicht zwingend notwendig ist (JAMIESON et al. 1991), belegen etliche Studien eine Akkumulation von Thrombozytenaggregaten auf nicht-endothelialisierten Glutaraldehyd-fixierten Klappenprothesen (FERRANS et al. 1978; LEHNER et al. 1997). Ziel der Endothelzellbeschichtung Glutaraldehyd-fixierter Prothesen ist daher unter anderem eine Reduzierung thromboembolischer Zwischenfälle nach biologischem Herzklappenersatz (GRIMM et al. 1991; FISCHLEIN et al. 1992; GULBINS et al. 2003; NEUENSCHWANDER und HOERSTRUP 2004). Auch in den vorliegenden Untersuchungen können auf den Prothesen der Kontrollgruppe Thromben gefunden werden (Abb. 19/ 20). Bildung und Abbau von Thromben werden durch eine Vielzahl an Substanzen reguliert, welche von Endothelzellen synthetisiert werden (FISCHLEIN und FASOL 1996). So spielen beispielsweise PGI₂, TF, Antithrombin III, Protein S, Thrombomodulin, Faktor V und viele andere Substanzen eine wichtige Rolle (BECKER 1991).

Das Fehlen solcher thrombotischer Auflagerungen bei den Klappenprothesen der Versuchsgruppe ist ein bedeutendes Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen und lässt schlussfolgern, dass die Endothelzellen ihre antithrombotischen Eigenschaften nach In-vitro-Züchtung und Implantation nicht verlieren. LEHNER et al. (1997) erzielen ähnliche Ergebnisse nach Endothelzellbeschichtung kryopräservierter Allografts.

Wie die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen zeigen, kann eine längerfristige Endothelzellbeschichtung von Glutaraldehyd-fixierten Herzklappen erreicht werden (Abb. 23/ 25/ 26). Diese bleibt erstmals auch in vivo unter physiologischen Beanspruchungen im Hochdruckgebiet des Körperkreislaufs über eine Dauer von drei Monaten stabil und stellt damit ein zentrales Ergebnis dieser Studie dar.

In der Vergangenheit gelingt lediglich die längerfristige Beschichtung bzw. In-vivo-Rebesiedlung von dezellularisierten Herzklappen im Niederdruckgebiet des Kreislaufes (GOLDSTEIN et al. 2000; STEINHOFF et al. 2000; LEYH et al. 2003a), die stabile Beschichtung Aldehyd-fixierter Klappen scheint nicht möglich (GOLDSTEIN et al. 2000).

Zur Verwendung dezellularisierter Matrices ist jedoch anzumerken, dass die Beobachtung einer In-vivo-Rebesiedlung zwar ein Phänomen ist, welches im Tierversuch regelmäßig beobachtet werden kann; auf den Menschen ist ein solcher Vorgang laut STOCK et al. (2002)

DISKUSSION

jedoch nur begrenzt übertragbar. Gleiches gilt auch für den Einsatz unbeschichteter Dünndarm-Mukosa (WU et al. 1995; STOCK et al. 2002).

Außerdem zeigen erste klinische Studien bei Kindern, dass der Einsatz dezellularisierter Klappen (unbeschichtet) starke Entzündungsreaktionen zur Folge hat (SIMON et al. 2003).

Obwohl diese Klappen von lebenden Zellen und Zelldebris befreit sind, ist es wichtig zu beachten, dass die intakte Extrazellulärmatrix durchaus eine Immunreaktion des Empfängers auslösen kann (COITO und KUPIEC-WEGLINSKI 1996). SCHMIDT und BAIER (2000) vermuten, dass diese Immunreaktion bei Verwendung von Xenografts ausgeprägter ist als bei Verwendung von Allografts, und dass sie zu Entzündungsreaktionen und letzten Endes zu Transplantatabstoßung führt. Aus diesem Grund könnte trotz Dezellularisierung eine weitere Fixierung der Prothese nötig sein.

Neben dem Risiko immunologischer Reaktionen ist bei Verwendung dezellularisierter Klappen des Weiteren das Risiko der Krankheitsübertragung zu beachten (NEUENSCHWANDER und HOERSTRUP 2004).

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Klappenwand fallen bei einem Tier Gefäßeinsprossungen auf (positiv gefärbte Endothelzellen in der Wand, Abb. 26). Da die verwendete Färbemethode dazu dient, ausschließlich vitale, Faktor-VIII-produzierende Zellen anzufärben, durch die Glutaraldehyd-Fixierung jedoch sämtliche vitale Zellen abgetötet werden, kann es sich bei diesen Gefäßen nicht um die physiologischerweise in der Wand der Aorta vorhandenen Vasa vasorum handeln. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei diesem Befund vielmehr um eine entzündungsbedingte Neovaskularisation. Grund hierfür könnte entweder eine unspezifische Fremdkörperreaktion oder eine wie durch SCHMIDT und BAIER (2000) beschriebene spezifische immunologische Reaktion auf Glutaraldehyd-fixierte Prothesen sein. Glutaraldehyd kann -vermutlich durch das Abtöten lebender Zellen und die Stabilisierung der Kollagentripelhelix- eine Immunantwort zwar weitgehend unterdrücken (NIMNI et al. 1987), jedoch nicht vollständig verhindern (DAHM et al. 1990). So kann beispielsweise gezeigt werden, dass die Implantation von Glutaraldehyd-fixiertem Gewebe bei Ratten sowohl eine T-Zell- als auch eine humorale Immunantwort hervorruft (DAHM et al. 1990).

4.5 Einschränkungen des Modells und Ausblick

Die Ergebnisse des hier vorgestellten heterotopen Klappenmodells sind aus mehreren Gründen nicht ohne weiteres mit den Ergebnissen anderer Studien vergleichbar: da das Ausmaß der Degeneration von biologischen Prothesen von der mechanischen Beanspruchung (hier besonders vom Verschlussdruck) abhängig ist (EDWARDS et al. 1995), sind weitere quantifizierbare Untersuchungen nötig, um die Belastung für die in heterotoper Position implantierten Klappen genau beurteilen zu können. Unter anderem der nicht komplette Klappenschluss und der im Vergleich zur orthotopen Implantation geringere Durchfluss lassen vermuten, dass die jeweilige Beanspruchung der Prothese nicht identisch ist. Ähnliches gilt für die Beurteilung der Endothelzellbeschichtung: da angenommen wird, dass unter anderem die an den Klappen herrschenden Scherkräfte die dauerhafte Beschichtung von Klappenprothesen beeinflussen können (LEHNER et al. 1997), sind weitere Untersuchungen notwendig, um eine genaue Aussage hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse machen zu können. Da sonographisch jedoch mit Ausnahme eines Tieres dargestellt werden kann, dass die implantierten Klappen selbst bei nur mäßiger Bewegung nicht der Aortenwand anliegen, sondern vielmehr in das Gefäßlumen ragen und hier einem dauerhaften Blutstrom ausgesetzt sind, ist davon auszugehen, dass die hier wirkenden Scherkräfte mit denen in orthotoper Position zumindest annähernd vergleichbar oder eventuell sogar höher sind.

Obwohl die für diesen Versuch gewählte Tierzahl für die Erprobung einer gänzlich neuen Operationsmethode durchaus gerechtfertigt ist, sind für zukünftige Versuche größer angelegte Studien notwendig, um statistisch repräsentativere Ergebnisse zu erhalten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Vorliegende Arbeit untersucht ein bislang in der Literatur nicht beschriebenes heterotopes Klappenmodell zur Durchführung von Versuchen zum biologischen Herzklappenersatz beim Schaf. Hierbei implantiert man porzine Glutaraldehyd-fixierte Herzklappenprothesen in die Aorta descendens und hält durch Anlage eines Shunts zwischen Aorta descendens und linkem Vorhof die Segelbewegungen der implantierten Klappe aufrecht.

Des Weiteren prüft vorliegende Arbeit, ob eine auf die implantierten Prothesen verbrachte wirtseigene Endothelzellschicht *in vivo* über einen Zeitraum von drei Monaten stabil bleibt, und ob diese Endothelzellschicht das Risiko thromboembolischer Zwischenfälle sowie degenerative Vorgänge an der Klappe zu reduzieren vermag. Hierzu werden sechs Tieren mit Endothelzellen beschichtete Klappenprothesen (Versuchsgruppe) und drei Tieren (Kontrollgruppe) unbeschichtete Prothesen für einen Beobachtungszeitraum von drei Monaten implantiert. Histologische, rasterelektronen- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Prothesen beider Gruppen werden nach Klappenexplantation miteinander verglichen.

Eine Behandlung der Glutaraldehyd-fixierten Herzklappenprothesen mit Zitronensäure soll die Hydrophilie der Klappenoberfläche erhöhen und auf diese Weise die Zellanheftungsfähigkeit verbessern. Nach Behandlung der Prothesen mit Zitronensäure erfolgt die Beschichtung mit zuvor aus Teilstücken der rechten V. jugularis externa des Empfängertieres gewonnenen und in Kultur angezüchteten Fibroblasten und Endothelzellen. Die Implantation der Prothese wird in tiefer Allgemeinanästhesie und unter adäquater Analgesie durchgeführt. Das Narkosemonitoring beinhaltet EKG-Ableitung, Pulsoximetrie, Messung des systemischen und des linksatrialen Blutdrucks, kontinuierliche Blutgasmessung, Kapnometrie und Spirometrie. Segelbewegungen der Klappe und Funktion des angelegten Shunts werden sonographisch untersucht.

Während des Abklemmens der Aorta kann bei allen Tieren eine ausreichende Perfusion der lebenswichtigen Organe gewährleistet werden, sodass es auch postoperativ bei keinem der Tiere zu Komplikationen kommt.

Die intraoperative Ultraschalluntersuchung zeigt lediglich bei einem Tier keine systolischen/diastolischen Segelbewegungen. Nach einer Beobachtungsdauer von drei Monaten kann sonographisch bei allen Tieren ein funktionierender Shunt dokumentiert werden; die Segel

ZUSAMMENFASSUNG

von drei Tieren lassen jedoch keine Bewegungen erkennen. Mit einer Ausnahme weisen alle Segel Anzeichen einer Degeneration auf.

Die Prothesen aller Tiere der Versuchsgruppe lassen nach Ablauf von drei Monaten ein zusammenhängendes Endothel erkennen. Die Oberfläche dieser Prothesen ist glatt und frei von Thromben. Bei der Untersuchung der übrigen Prothesen (Kontrollgruppe) lassen sich auf nicht endothelialisierter Unterlage Thromben nachweisen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass eine endotheliale Beschichtung Glutaraldehydfixierter Klappenprothesen möglich ist und auch in vivo über einen längeren Zeitraum stabil bleibt. Diese Beschichtung vermag zwar scheinbar die Bildung von Thromben zu reduzieren, eine verminderte Klappendegeneration resultiert jedoch nicht. Das untersuchte heterotope Klappenmodell stellt aufgrund der im Vergleich zur orthotopen Implantation geringeren Invasivität und Mortalität eine geeignete Alternative für zukünftige Versuche zum Herzklappenersatz dar.

6 SUMMARY

Heterotopic implantation of tissue engineered aortic valve bioprostheses in a sheep model

The present study investigates a so far unpublished model for the heterotopic implantation of heart valve bioprostheses in the sheep. Porcine glutaraldehyde-fixed bioprostheses are being implanted in the descending aorta, while leaflet motions are maintained by means of implantation of a descending aorta-to-left atrium conduit.

Furthermore this study examines whether endothelial lining of these bioprostheses remains stable over a three months period of in vivo implantation and whether it accomplishes reduction of thromboembolic complications and valve degeneration. Therefore six animals receive endothelialized bioprostheses (study group) whereas in three animals (control group) unlined prostheses are being implanted for a three months' period. Histological examination, as well as scanning electron and fluorescence microscopy of the prostheses of both groups undergo evaluation.

Treatment of glutaraldehyde-fixed bioprostheses with citric acid is thought to increase hydrophilia of the surface and therefore promote endothelial cell attachment. After treatment with citric acid, prostheses are being lined with endothelial cells and fibroblasts that have previously been obtained from the recipient's right external jugular vein. Implantation is performed under deep general anaesthesia and appropriate analgesic regimen. Anaesthetic monitoring includes ECG, pulse oximetry, measurement of systemic and left atrial blood pressure, blood gas analysis, measurement of Et CO₂ and spirometry. Leaflet motions and functioning of the implanted conduit are being examined by direct sonography.

Adequate perfusion of all vital organs can be maintained during crossclamping of the aorta. No postoperative complications occur.

Intraoperative sonography reveals systolic/ diastolic leaflet movements in all animals but one. After three months, all shunts are patent. Sonography doesn't show leaflet motions in three animals. Leaflet degeneration is present in six of seven animals.

Prostheses of all animals in the study group revealed a confluent endothelium after three months. The surface of these prostheses is smooth and free of thrombi. Thrombi can be found

SUMMARY

during examination of the remaining prostheses (control group), located on a non-endothelialized surface.

In conclusion it may be noted that endothelial cell seeding onto glutaraldehyde-fixed bioprostheses is possible and the cell layer remains stable for three months in an in-vivo-model. Although the endothelial cell layer seems to reduce the formation of thrombi, a reduced occurrence of valve degeneration does not result. Because of the -compared to the orthotopic valve implantation- lower invasiveness and mortality, the investigated heterotopic model is an alternative for future experiments in heart valve surgery.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Aasen, A. O., F. Resch and B. J. Semb (1980). "Development of a canine model for long-term studies after mitral valve replacement with the Hall-Kaster prosthesis." Eur Surg Res. **12**: 199-207.

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

Aouad, J., E. M. Wright and T. W. Shaner (1981). "Anesthesia evaluation of Ketamine and Xylazine in calves." Bovine Pract. **2**: 22-31.

Badylak, S. F., R. Record, K. Lindberg, J. Hodde and K. Park (1998). "Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth." J Biomater Sci Polym. **9**: 863-878.

Barnhart, G. R., M. Jones, T. Ishihara, D. M. Rose, A. M. Chavez and V. J. Ferrans (1982). "Degeneration and calcification of bioprosthetic cardiac valves. Bioprosthetic tricuspid valve implantation in sheep." Am J Pathol. **106**: 136-139.

Becker, R. C. (1991). "Seminars in thrombosis, thrombolysis and vascular biology." Cardiology **78**: 13-22.

Bengtsson, L., B. Ragnarson and A. Haegerstrand (1993). "Lining of viable and nonviable allogeneic and xenogeneic cardiovascular tissue with cultured adult human venous endothelium." J Thorac Cardiovasc Surg. **106**: 434-443.

Bianco, R. W., J. A. St. Cyr and J. R. Schneider (1986). "Canine model for the long-term evaluation of prosthetic mitral valves." J Surg Res. **41**: 134-140.

Binet, J., C. G. Duran, A. Carpentier and J. Langlois (1965). "Heterologous aortic valve transplantation." Lancet. **2**: 1275.

Bonow, R. O. (1985). "Survival and functional results after valve replacement for aortic regurgitation from 1976 to 1983." Circulation **72**: 1244.

Burr, L. H., W. R. E. Jamieson, A. I. Munro, R. T. Miyagishima and E. Germann (1995). "Porcine bioprostheses in the elderly: clinical performance by age groups and valve positions." Ann Thorac Surg. **60**: 264-269.

Burrows, F. A., J. R. Klinck and M. Rabinovitch (1986). "Pulmonary hypertension in children: perioperative management." Can Anaesth Soc J. **33**: 606-628.

Chanda, J. (1995). "Prevention of calcification of heart valve bioprostheses: an experimental study in rat." Ann Thorac Surg. **60**: 339-342.

Chen, W., F. J. Schoen and R. J. Levy (1994). "Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves." Circulation. **90**: 323-329.

LITERATURVERZEICHNIS

- Chenoweth, D. E., S. W. Cooper, T. E. Hugh, R. W. Stewart, E. H. Blackstone and J. W. Kirklin (1981). "Complement activation during cardiopulmonary bypass; evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins." New Engl J Med. **304**: 497.
- Cohn, L. H., J. J. Collins and V. J. Disesa (1989). "Fifteen-year experience with 1678 Hancock porcine bioprosthetic heart valve replacements." Ann Surg **210**: 435-442.
- Coito, A. J. and J. W. Kupiec-Weglinski (1996). "Extracellular matrix proteins: bystanders or active participants in the allograft rejection cascade?" Ann Transplant. **1**: 14-18.
- Dahm, M., B.-J. Chang, O. Prucker, M. Pierkes, T. Alt, E. Mayer, J. Rühle and H. Oelert (2001). "Surface attached ultrathin polymer monolayers for control of cell adhesion." Ann Thorac Surg. **71**: 437-440.
- Dahm, M., W. D. Lyman, A. B. Schwell, S. M. Factor and R. W. M. Frater (1990). "Immunogenicity of glutaraldehyde-tanned bovine pericardium." J Thorac Cardiovasc Surg. **99**: 1082-1090.
- Dahm, M., D. Prüfer, O. Oster, E. Groh and H. Oelert (1996). "Effects of surface seeding of bio-implants with vital cells on the calcium uptake of biological materials for heart valve replacement." J Heart Valve Dis. **5**: 148-151.
- Dries, D. J., S. D. Hughes, S. F. Mohammad, G. L. Burns, G. McGregor, E. Ilyia, B.-Y. Chiang, Y. Hamanaka, K. D. Murray, D. B. Olsen and W. J. Kolff (1984). "Acute hematologic response of sheep to cardiopulmonary bypass and total heart replacement." Trans Am Soc Artif Intern Organs. **30**: 117-120.
- Edmunds, L. H. J. (1987). "Thrombotic and bleeding complications of prosthetic heart valves." Ann Thorac Surg. **44**: 430-445.
- Edwards, T. J., S. A. Livesey, I. A. Simpson, J. L. Monro and S. J. K. Ross (1995). "Biological valves beyond fifteen years: the Wessex experience." Ann Thorac Surg. **60**: 211-215.
- Erhardt, W., J. Henke and J. Haberstroh (2004). "Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier." Schattauer, Stuttgart: 691-723.
- Erhardt, W., R. Köstlin, R. Seiler, G. Tonzer, B. Tielebier-Langenscheidt, R. Limmer, U. Pfeiffer and G. Blümel (1985). "Die respiratorisch-funktionelle Hypoxie beim Wiederkäuer unter Allgemeinanästhesie." Tierärztl. Prax. Suppl. **1**: 45-49.
- Eybl, E., A. Griesmacher, M. Grimm and E. Wolner (1989). "Toxic effects of aldehydes released from fixed pericardium on bovine aortic endothelial cells." J Biomed Mater Res. **23**: 1355-1365.
- Eybl, E., M. Grimm, M. Grabenwöger, P. Böck, M. M. Müller and E. Wolner (1992). "Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials." J Thorac Cardiovasc Surg. **104**: 763-769.
- Farzaneh-Far, A., D. Proudfoot, C. Shanahan and P. L. Weissberg (2001). "Vascular and valvar calcification: recent advances." Heart. **85**: 13-17.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ferrans, V. J., T. L. Spray, M. E. Billingham and W. C. Roberts (1978). "Ultrastructure of Hancock porcine valvular heterografts. Pre- and postimplantation changes." Circulation **58**: 10-18.
- Fischlein, T. and R. Fasol (1996). "In vitro endothelialization of bioprosthetic heart valves." J Heart Valve Dis. **5**: 58-65.
- Fischlein, T., G. Lehner, W. Lante, M. Fittkau, J. G. Murphy, C. Weinhold and B. Reichart (1994). "Endothelialization of cardiac valve bioprostheses." Int J Artif Organs. **17**: 345-352.
- Fischlein, T., G. Lehner, W. Lante and B. Reichart (1992). "Endothelialization of aldehyde-fixed cardiac valve bioprostheses." Transplant Proc. **24**: 2988.
- Flameng, W., S. Ozaki, J. Yperman, P. Herijgers, B. Meuris, A. Van Lommel and E. Verbeke (2001). "Calcification characteristics of porcine stented valves in a juvenile sheep model." Ann Thorac Surg. **71**: 401-405.
- Frater, R. W. M., G. Gong, D. Hoffmann and K. Liao (1992). "Endothelial covering of biological artificial heart valves." Ann Thorac Surg. **53**: 371-372.
- Gallo, J., F. Nistal, R. Blasquez, E. Arbe and E. Artinano (1988). "Incidence of primary tissue valve failure in porcine bioprosthetic heart valves." Ann Thorac Surg. **45**: 66-70.
- Girardot, M.-N., M. MacDonald, I. Duarte, W. M. Brown and J.-M. D. Girardot (1997). "Advances in anticalcific and antidegenerative treatment of heart valve bioprostheses." Austin, TX: Silent Partners, Inc.
- Goldstein, S., D. R. Clarke, S. P. Walsh, K. S. Black and M. F. O'Brien (2000). "Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft." Ann Thorac Surg. **70**: 1962-1969.
- Gonzalez-Lavin, L., S. Bianchi, D. Graf, S. Amini and C. I. Gordon (1988). "Degenerative changes in fresh aortic root homografts in canine model: evidence of an immunologic influence." Transplant Proc. Supplement 1: 815-819.
- Gott, J. P., M.-N. Girardot, J.-M. D. Girardot, J. D. Hall, J. D. Whitlark, W. S. Horsley, L. M. A. Dorsey, R. J. Levy, W. Chen, F. J. Schoen and R. A. Guyton (1997). "Refinement of the alpha aminooleic acid bioprosthetic valve anticalcification technique." Ann Thorac Surg. **64**: 50-58.
- Gott, J. P., Pan-Chih and L. M. A. Dorsey (1992). "Calcification of porcine valves: a successful new method of antiminerallization." Ann Thorac Surg. **53**: 207-126.
- Gregoric, I. D., D. Tamez, M. N. Karabulut, R. Cervera, J. Conger, K. Eya, D. Lapeyre, B. Radovancevic and O. H. Frazier (2001). "Aortic valve implantation in the calf: a successful approach using heartport cannulation and minimally invasive techniques." J Heart Valve Dis. **10**: 675-680.
- Grehan, J. F., I. Casagrande, E. L. Oliveira, P. C. Santos, C. J. Pessa, L. R. Gerola, B. Enio, J. Mrachek, M. E. Norris, M. T. Lahti and R. W. Bianco (2001). "A juvenile sheep model for the

LITERATURVERZEICHNIS

long-term evaluation of stentless bioprotheses implanted as aortic root replacements." J Heart Valve Dis. **10**: 505-512.

Grimm, M., E. Eybl, M. Grabenwöger, A. Griesmacher, U. Losert, P. Böck, M. M. Müller and E. Wolner (1991). "Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium." J Thorac Cardiovasc Surg. **102**: 195-201.

Grimm, M., E. Eybl, M. Grabenwöger, H. Spreitzer, W. Jager, P. Böck, M. M. Müller and E. Wolner (1992). "Glutaraldehyde affects biocompatibility of bioprosthetic heart valves." Surgery. **111**: 74-78.

Gross, C., W. Harringer, R. Mair, G. Wimmer-Greinecker, U. Klima, K. Sihorsch, R. Hofmann, H. Beran and P. Brücke (1995). "Aortic valve replacement: is the stentless xenograft an alternative to the homograft? early results of a randomized study." Ann Thorac Surg. **60**: 418-421.

Gulbins, H., A. Goldemund, I. Anderson, U. Haas, A. Uhlig, B. Meiser and B. Reichart (2003). "Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves." J Thorac Cardiovasc Surg. **125**: 592-601.

Gura, T. A., K. L. Wright, A. Veis and C. L. Webb (1997). "Identification of specific calcium-binding non-collagenous proteins associated with glutaraldehyde-preserved bovine pericardium in the rat subdermal model." J Biomed Mater Res. **35**: 483-495.

Herijgers, P., S. Ozaki, E. Verbeke, A. Van Lommel, R. Ràcz, M. Zietkiewicz, B. Perek and W. Flameng (1999). "Calcification characteristics of porcine stentless valves in juvenile sheep." Eur J Cardiothorac Surg. **15**: 134-142.

Hirsh, D., J. Drader, T. J. Thomas, F. J. Schoen, J. T. Levy and R. J. Levy (1993). "Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate." J Biomed Mater Res. **27**: 1477-1484.

Hossain, M. A., D. F. Cottrell, M. A. Camburn and J. R. Campbell (1988a). "Gastro-oesophageal reflux in halothane anaesthetized sheep. Effects of feeding and positioning." Vet Res Commun. **12**: 227-232.

Hossain, M. A., D. F. Cottrell, M. A. Camburn and J. R. Campbell (1988b). "Motility of the oesophagus and gastro-oesophageal junction during halothane anesthesia in sheep." Vet Res Commun. **12**: 417-430.

Irwin, E., G. Lang and C. Rose (1993). "Long term evaluation of prosthetic mitral valves in sheep." J Invest Surg. **6**: 133-141.

Jamieson, W. R. E., R. I. Hayden and R. T. Miyagishima (1991). "The Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis: clinical performance to 15 years." J Card Surg. **6**: 550.

Jasinski, M. J., Z. Kadziola, R. Keal and A. W. Sosnowski (2000). "'Mosaic' Medtronic bioprosthetic valve replacement clinical results and hemodynamical performance." J Cardiovasc Surg. **41**: 181-186.

- Jockenhoevel, S., G. Zund, S. P. Hoerstrup, K. Chalabi, J. S. Sachweh, L. Demircan, B. J. Messmer and M. Turina (2001). "Fibrin gel - advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering." Eur J Cardiothorac Surg. **19**: 424-430.
- Kidane, A. G., H. J. Salacinski, G. Punshon, B. Ramesh, K. S. Srari and A. M. Seifalian (2003). "Synthesis and evaluation of amphiphilic RGD derivatives: uses for solvent casting in polymers and tissue engineering applications." Med Biol Eng Comput. **41**: 740-745.
- Kim, K. M., G. A. Herrera and H. D. Battarbee (1999). "Role of glutaraldehyde in calcification of porcine aortic valve fibroblasts." Am J Pathol. **154**: 843-852.
- Kim, W. G., Y. T. Kim, S. K. Park, H. C. Kim, J. W. Suh, J. W. Park, W. K. Paik, B. H. Lee, B. G. Min and J. R. Rho (1997). "Do sheep really have problems with cardiopulmonary bypass for total artificial heart implantation." Artif Organs. **21**: 154-159.
- Kirklin, J. K., S. Westaby, E. H. Blackstone, J. W. Kirklin, D. E. Chenoweth and A. D. Pacifico (1983). "Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass." J Thorac Cardiovasc Surg. **86**: 845.
- Klinke, R. and S. Silbernagl (1994). "Lehrbuch der Physiologie." 120.
- Kurowski, R. and V. Deseniß (2004). Anästhesie in Frage und Antwort.
- Lee, C. H., N. Vyavahare and R. Zand (1998). "Inhibition of aortic wall calcification in bioprosthetic heart valves by ethanol pretreatment: biochemical and biophysical mechanisms." J Biomed Mater Res. **42**: 30-37.
- Leek, B. F. (1983). "Clinical diseases of the rumen: a physiologist's view." Vet Rec. **113**: 10-14.
- Lehner, G., T. Fischlein, G. Baretton, J. G. Murphy and B. Reichart (1997). "Endothelialized biological heart valve prostheses in the non-human primate model." Eur J Cardiothorac Surg. **11**: 498-504.
- Levy, R. J., F. J. Schoen and J. T. Levy (1983). "Biologic determinants of dystrophic calcification on osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats." Am J Pathol. **113**: 143-155.
- Levy, R. J., F. J. Schoen, F. S. Sherman, J. Nichols, M. A. Hawley and S. A. Lund (1986). "Calcification of subcutaneously implanted type I collagen sponges: effects of glutaraldehyde and formaldehyde pretreatments." Am J Pathol. **122**: 71-82.
- Leyh, R. G., M. Wilhelmi, A. Haverich and H. Mertsching (2003a). "A xenogeneic acellularized matrix for heart valve tissue engineering: in vivo study in a sheep model." Z Kardiol **92**: 938-946.
- Leyh, R. G., M. Wilhelmi, P. Rebe, S. Fischer, T. Kofidis, A. Haverich and H. Mertsching (2003b). "In vivo repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation." Ann Thorac Surg. **75**: 1457-1463.
- Liebsch, R. (2001). "Kurzlehrbuch Neurologie." 76-77.

Magilligan, D. J., J. W. Lewis, P. Stein and M. Alam (1989). "The porcine bioprosthetic heart valve: experience at 15 years." Ann Thorac Surg. **48**: 324-330.

Maizato, M. J. S., O. Z. Higa, M. B. Mathor, M. A. P. Camillo, P. J. Spencer, R. N. Pitombo, C. A. C. Zavaglia and A. A. Leirner (2003). "Glutaraldehyde-treated bovine pericardium: effects of lyophilization on cytotoxicity and residual aldehydes." Artif Organs. **27**: 692-694.

Matheny, R. G., M. L. Hutchison, P. E. Dryden, M. D. Hiles and C. J. Shaar (2000). "Porcine small intestine submucosa as a pulmonary valve leaflet substitute." J Heart Valve Dis. **9**: 769-774.

McMullan, D. M., J. M. Bekker, A. J. Parry, M. J. Johengen, A. Kon, R. S. Heidersbach, S. M. Black and J. R. Fineman (2000). "Alterations in endogenous nitric oxide production after cardiopulmonary bypass in lambs with normal and increased pulmonary blood flow." Circulation. **102**: III172 - III178.

Moritz, A., M. Grimm, E. Eybl, M. Grabenwöger, U. Windberger, P. Böck and E. Wolner (1990). "Improved biocompatibility by postfixation treatment of aldehyde fixed bovine pericardium." ASAIO Trans. **36**: 300-303.

Neuenschwander, S. and S. P. Hoerstrup (2004). "Heart valve tissue engineering." Transplant Immunology. **12**: 359-365.

Nickel, R., A. Schummer and E. Seiferle (1992). "Lehrbuch der Anatomie der Haustiere." **4**: 209-210.

Nimni, M. E., D. Cheung, B. Strates, M. Kodama and K. Sheikh (1987). "Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement." J Biomed Mater Res. **21**: 741-771.

Ogle, M. F., S. J. Kelly, R. W. Bianco and R. J. Levy (2003). "Calcification resistance with aluminumethanol treated porcine aortic valve bioprostheses in juvenile sheep." Ann Thorac Surg. **75**: 1267-1273.

Pibarot, P., J. G. Dumesnil, M. H. Leblanc, P. Cartier and J. Metras (1999). "Changes in left ventricular mass and function after aortic valve replacement: a comparison between stentless and stented bioprosthetic valves." J Am Soc Echocardiogr. **12**: 981-987.

Pupello, D. F., L. N. Bessone, S. P. Hiro, E. Lopez-Cuenca, M. S. Glatteer Jr., W. W. Angell, J. C. Brock, M. J. Alkire, E. G. Izzo, G. Sanabria and G. Ebra (1995). "Bioprosthetic valve longevity in the elderly: an 18-year longitudinal study." Ann Thorac Surg. **60**: 270-275.

Reddy, V. M., K. D. Hendricks-Munoz, H. A. Rajasinghe, F. L. Hanley and J. R. Fineman (1997). "Post-cardiopulmonary bypass pulmonary hypertension in lambs with increased pulmonary blood flow - a role for endothelin." Circulation. **95**: 1054-1061.

Ross, D. (1962). "Homograft replacement of the aortic valve." Lancet. **2**: 487-488.

Schäfer, R. and M. Eberhardt (2002). "Klinikleitfaden Anästhesie." **4**: 153.

LITERATURVERZEICHNIS

- Schenke-Layland, K., F. Opitz, M. Gross, C. Döring, K. J. Halbhuber, F. Schirrmeister, T. Wahlers and U. A. Stock (2003). "Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals - an in vitro study." Cardiovasc Res. **60**: 497-509.
- Schmidt, C. E. and J. M. Baier (2000). "Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering." Biomaterials **21**: 2215-2231.
- Schoen, F. J., R. J. Levy and H. R. Piehler (1992). "Pathological considerations in replacement cardiac valves." J Soc Cardiovasc Pathol. **1**: 29-52.
- Shinoka, T., C. Breuer and R. Tanel (1995). "Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement in a lamb model." Ann Thorac Surg. **60**: 513-516.
- Shinoka, T., D. Shum-Tim, P. Ma, R. Tanel, N. Isogai, R. Langer, J. P. Vacanti and J. Mayer (1998). "Creation of a viable pulmonary artery autograft through tissue engineering." J Thorac Cardiovasc Surg. **115**: 536-546.
- Simon, P., M. T. Kasimir and G. Seebacher (2003). "Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients." Eur J Cardiothorac Surg. **23**: 1002-1006.
- Steinhoff, G., U. A. Stock, K. Najibulla, H. Mertsching, A. Timke, R. R. Meliss, K. Pethig, A. Haverich and A. Bader (2000). "Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits - in vivo restoration of valve tissue." Circulation. **102** [suppl. III]: III-50 - III-55.
- Stock, U. A., M. Nagashima, P. N. Khalil, G. D. Nollert, T. Herden, J. S. Sperling, A. Moran, J. Lien, D. P. Martin, F. J. Schoen, J. P. Vacanti and J. E. J. Mayer (2000). "Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation." J Thorac Cardiovasc Surg. **119**: 732-740.
- Stock, U. A., J. P. Vacanti, J. E. J. Mayer and T. Wahlers (2002). "Tissue engineering of heart valves - current aspects." J Thorac Cardiovasc Surg. **50**: 184-193.
- Thiene, G., F. Laborde, M. Valente, P. Gallix, E. Talenti, F. Calabrese and A. Piwnica (1989). "Morphological survey of a new pericardial valve prosthesis (Pericarbon): long-term animal experimental model." Eur J Cardiothorac Surg. **3**: 65-74.
- Thubrikar, M. J., J. D. Deck, J. Aouad and S. P. Nolan (1983). "Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves." J Thorac Cardiovasc Surg **86**: 115-125.
- Timek, T. A., D. T. Lai, F. A. Tibayan, P. Dagum, G. T. Daughters, D. Liang, N. B. Ingels and D. C. Miller (2002). "Hemodynamic performance of an unstented xenograft mitral valve substitute." J Thorac Cardiovasc Surg. **124**: 541-552.
- Trump, B. F. and I. R. Berezsky (1992). "The role of cytosolic Ca²⁺ in cell injury, necrosis and apoptosis." Curr Opin Cell Biol. **4**: 89-109.
- Voytik-Habrin, S. L., A. O. Brightman, M. R. Kraine, B. Waisner and S. F. Badylak (1997). "Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa." J Cell Biochem. **67**: 478-491.

LITERATURVERZEICHNIS

Vrandecic, M., F. A. Fantini, B. G. Filho and E. Vrandecic (2000). "Retrospective clinical analysis of stented vs. stentless porcine aortic bioprostheses." Eur J Cardiothorac Surg. **18**: 46-53.

Vyavahare, N., D. Hirsch and E. Lerner (1998). "Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships." J Biomed Mater Res. **40**: 577-585.

Vyavahare, N., D. Hirsch, E. Lerner, J. Z. Baskin, F. J. Schoen, R. W. Bianco, H. S. Kruth, R. Zand and R. J. Levy (1997). "Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation." Circulation. **95**: 479-488.

Vyavahare, N., P. L. Jones, D. Hirsch, F. J. Schoen and R. J. Levy (2000). "Prevention of glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve calcification by alcohol pretreatment: further mechanistic studies." J Heart Valve Dis. **9**: 561-566.

Walluscheck, K. P., G. Steinhoff, S. Kelm and A. Haverich (1996). "Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides." Eur J Vasc Endovasc Surg **12**: 321-330.

Walther, T., V. Falk, C. Binner, N. Löscher, A. Schubert, T. Rauch, U. von Oppell, R. Autschbach and F. W. Mohr (2000). "Experimental aortic stenosis and corresponding left ventricular hypertrophy in sheep." J Invest Surg **13**: 327-331.

Webb, C. L., W. E. Flowers, J. Boyd, E. L. Rosenthal, F. J. Schoen and R. J. Levy (1990). "Al+++ binding studies, and metallic cation effects on bioprosthetic heart valve calcification in the rat subdermal model." ASAIO. **36**: 56-59.

Webb, C. L., N. M. Nguyen, F. J. Schoen and R. J. Levy (1992). "Calcification of allograft aortic wall in a Rat subdermal model." Am J Pathol. **141**: 487-496.

Weissenstein, C., P. Human, D. Bezuidenhout and P. Zilla (2000). "Glutaraldehyde detoxification in addition to enhanced amine cross-linking dramatically reduces bioprosthetic tissue calcification in the rat model." J Heart Valve Dis. **9**: 230-240.

Wilson, G. J., D. W. Courtman, P. Klement, J. M. Lee and H. Yeger (1995). "Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement." Ann Thorac Surg. **60**: 353-358.

Wu, M. H., Y. Kouchi, Y. Onuki, Q. Shi, H. Yoshida, S. Kaplan, R. F. Viggers, R. Ghali and L. R. Sauvage (1995). "Effects of differential shear stress on platelet aggregation, surface thrombosis, and endothelialization of bilateral carotid-femoral grafts in the dog." J Vasc Surg. **22**: 382-392.

Zhang, J., C. Toher, M. Erhard, Y. Zhang, K. Ugurbil, R. J. Bache, T. Lange and D. C. Homans (1997). "Relationships between myocardial bioenergetic and left ventricular function in hearts with volume-overload hypertrophy." Circulation **96**: 334-343.

LITERATURVERZEICHNIS

Zilla, P., L. Fullard, P. Trescony, J. Meinhart, D. Bezuidenhout, M. Gorlitzer, P. Human and U. von Oppell (1997a). "Glutaraldehyde detoxification of aortic wall tissue: a promising perspective for emerging bioprosthetic valve concepts." J Heart Valve Dis. **6**: 510-520.

Zilla, P., C. Weissenstein, M. Bracher, Y. Zhang, W. Koen, P. Human and U. van Opel (1997b). "High glutaraldehyde concentrations reduce rather than increase the calcification of aortic wall tissue." J Heart Valve Dis. **6**: 502-509.

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht zu möglichen Klappenersatzmaterialien nach NEUENSCHWANDER und HOERSTRUP (2004).....	16
Tabelle 2: Übersicht über die Gruppeneinteilung und den Versuchsablauf.....	24
Tabelle 3: Blutgasanalyse	39
Tabelle 4: Sauerstoffsättigung und expiratorische CO ₂ -Werte während Thorakotomie	40
Tabelle 5: Systolischer Blutdruck (mmHg).....	42
Tabelle 6: Herzfrequenzen (1/min)	43
Tabelle 7: Sonographische und makroskopische Beurteilung der Klappe (Kontrollgruppe)...	48
Tabelle 8: Sonographische und makroskopische Beurteilung der Klappe (Versuchsgruppe) .	48

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Der apico-aortale Shunt; aus GOTT et al. (1997)	6
Abbildung 2: Bildung einer Schiff-Base	18
Abbildung 3: Salzbildung durch Reaktion mit Zitronensäure	19
Abbildung 4: Die Freestyle-Klappe	22
Abbildung 5: Der aorto-aortale Shunt, Schema.....	29
Abbildung 6: Der aorto-kardiale Shunt, Schema	30
Abbildung 7: Komplikationsrate der Venenentnahme	37
Abbildung 8: Komplikationsrate der Thorakotomie	37
Abbildung 9: Systolischer Blutdruck (mmHg) während verschiedener Operationsphasen.....	41
Abbildung 10: Herzfrequenzen (1/min) während verschiedener Operationsphasen	43
Abbildung 11: Der aorto-aortale Shunt in vivo	44
Abbildung 12: Echokardiographische Darstellung des aorto-kardialen Shunts	45
Abbildung 13: Der aorto-kardiale Shunt in vivo	45
Abbildung 14: Echokardiographische Darstellung der implantierten Klappenprothese.....	46
Abbildung 15: Echokardiographische Darstellung der implantierten Klappenprothese.....	47
Abbildung 16: Die explantierte Klappenprothese (Versuchsgruppe), Segel (Pfeile) retrahiert, keine Thromben.....	50
Abbildung 17: Thrombus auf nicht endothelialisierter Unterlage; drei Monate nach Implantation, 500x (Kontrollgruppe)	51
Abbildung 18: Thrombus auf nicht endothelialisierter Unterlage; drei Monate nach Implantation, 500x (Kontrollgruppe)	51
Abbildung 19: Übergang der Neointima auf nicht mit Zellen besiedelten Teil der Klappe; drei Monate nach Implantation, 2000x (Kontrollgruppe).....	52
Abbildung 20: Übergang der Neointima auf nicht mit Zellen besiedelten Teil der Klappe; drei Monate nach Implantation, 500x (Kontrollgruppe)	52
Abbildung 21: Segel drei Monate nach Implantation, 500x (Versuchsgruppe)	53
Abbildung 22: Segel vor der Implantation, 500x (Versuchsgruppe)	53
Abbildung 23: Faktor VIII- + Hämalan-Färbung Segel; 1 Tag nach Implantation, 10x (Versuchsgruppe)	54
Abbildung 24: Faktor VIII-+ Hämalan-Färbung Wand; Gefäßeinsprossung (?); drei Monate nach Implantation, 10x (Versuchsgruppe)	55

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopie; drei Monate nach Implantation, 10x (Versuchsgruppe)	56
Abbildung 26: Herzzyklus, nach KLINKE und SILBERNAGEL (1994)	61

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arterie
AOA	a-Aminoölsäure
bzw.	beziehungsweise
CO ₂	Kohlendioxid
Et CO ₂	expiratorischer Kohlendioxidpartialdruck
f	Frequenz
IE	internationale Einheit
IPPV	intermittierende positive Druckbeatmung
M	molar (mol/l)
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	Stichprobenumfang
P	Druck
PCWP	pulmonalkapillärer Verschlussdruck
PG	Prostaglandin
pH	pondus hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
R	Rangsumme
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SpO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Tab.	Tabelle
TF	tissue factor
U/min	Umdrehungen pro Minute
V.	Vene

11 DANKSAGUNG

Für die Übernahme der vorliegenden Dissertation an die tierärztliche Fakultät der LMU bedanke ich mich vielmals bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. W. Schmahl.

Frau Prof. S. Däbritz und Herrn Dr. H. Gulbins danke ich für die Überlassung des Themas, die Durchführung der komplizierten gefäßchirurgischen Operationen und die freundliche Zusammenarbeit mit der Abteilung für Herzchirurgie des Klinikums Großhadern. Durch sie war eine reibungslose Durchführung des praktischen Teils der Arbeit erst möglich.

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Klinikum rechts der Isar bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. B. Gänsbacher.

Mein ganz besonderer Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Erhardt für die mir jederzeit gewährte freundliche Unterstützung sowie die schnelle Durchsicht meiner Arbeit. An dieser Stelle möchte ich auch Frau Dr. J. Henke und Frau Dr. C. Faltermeier erwähnen und mich ebenfalls bei ihnen für die immer tatkräftige Hilfe während der einzelnen Operationen bedanken.

Für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse danke ich außerdem Herrn Prof. K. Osterkorn.

Für die Einführung in das Gebiet der Schafanästhesie und die ständige Hilfsbereitschaft danke ich ganz besonders Frau S. Klotz, Frau T. Meichner und Herrn A. Raith.

Ein großer Dank gilt auch Frau A. Lenz für die allzeit gewährte seelische sowie fachliche Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Einen herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung.

12 LEBENS LAUF

Name:	Korbinian Christoph Pieper	
Geburtsdatum, -ort:	29.05.1977, Wiesbaden	
Nationalität:	deutsch	
Familienstand:	ledig	
Schulbildung:	1983 – 1987	Dreikönigen Grundschule, Neuss
	1987 – 1996	Nelly-Sachs-Gymnasium, Neuss
	1993 – 1994	Cooperstown Central School, Cooperstown, USA
Zivildienst:	1996 – 1997	Ambulante Altenpflege, Caritasverband, Neuss
Berufsausbildung:	1997 – 2003	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
	2003	Approbation zum Tierarzt
Beruflicher Werdegang:	2003 – 2004	Anfertigung der Dissertation am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung des Klinikums rechts der Isar der TU München
	Seit 2003	Chirurgische Tierklinik der LMU München, Abteilung für Anästhesiologie