

Aus der Klinik für Herz-und Gefäßchirurgie

(Direktor: Prof. Dr. med. J. Cremer)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**PERKUTANER PULMONALKLAPPENERSATZ UND TISSUE ENGINEERING:
DIE HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG
SELBSTEXPANDIERENDER KLAPPENTRAGENDER STENTS
AUF DER BASIS EINES DEZELLULARISIERTEN KLAPPENGERÜSTES**



Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christians-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JOHANNES BETHGE

aus Hamm

Kiel 2009



Johannes Zedler

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

**PERKUTANER PULMONALKLAPPENERSATZ UND TISSUE ENGINEERING:
DIE HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG
SELBSTEXPANDIERENDER KLAPPENTRAGENDER STENTS
AUF DER BASIS EINES DEZELLULARISIERTEN KLAPPENGERÜSTES**

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

vorgelegt von

JOHANNES BETHGE

aus Hamm

Kiel 2009

1. Berichterstatter: PD Dr. G. Lutter

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bewig

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2009

Zum Druck genehmigt, Kiel den 18.06.2009

gez. Prof. Dr. Stick
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Die Herzklappen	1
1.2 Erkrankungen der Herzklappen	1
1.2.1 Ätiologie und Epidemiologie.....	1
1.2.2 Topographie der Herzklappenerkrankungen	2
1.2.3 Symptome und Diagnostik.....	2
1.2.4 Therapiemöglichkeiten	3
1.3 Herzklappenersatz	4
1.3.1 Mechanische Prothesen.....	4
1.3.2 Biologische Prothesen.....	5
1.4 Die ideale Herzklappe.....	7
1.5 Tissue Engineering und Guided Tissue Regeneration von Herzklappen	7
1.6 Perkutaner Herzklappenersatz	9
1.7 Fragestellung und Zielsetzung	10
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Die Herstellung der klappentragenden Stents	12
2.1.1 Versuchstiere	12
2.1.2 Reagenzien und Zellkulturmedien	12
2.1.3 Geräte.....	13
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	13
2.1.5 Der selbstexpandierende Nitinol Stent	14
2.1.6 Ovine Dünndarmmukosa	15
2.1.6.1 Vorbereitung des ovinen Dünndarms	15
2.1.6.2 Präparation des ovinen Dünndarms	15
2.1.6.3 Einnähen des Dünndarms in den Stent	16
2.1.7 Die porcine Pulmonalklappe.....	16
2.1.7.1 Präparation der Pulmonalklappe	17
2.1.7.2 Einnähen der Pulmonalklappe in den Stent	18
2.1.8 Inkubation des klappentragenden Stents in Antibiotikalösung.....	18
2.1.9 Dezellularisierungsprozess	19
2.1.10 Zellgewinnung und Zellkultur der Primärzellen.....	20
2.1.10.1 Arteria carotis Entnahme	20

2.1.10.2 Gewinnung und Anzucht von glatten Muskelzellen (SMC).....	21
2.1.10.3 Gewinnung und Anzucht von Endothelzellen	22
2.1.10.4 Beschichtung der well Platten und Zellkulturflaschen mit Gelatine	22
2.1.10.5 Mediumwechsel.....	23
2.1.10.6 Trypsinieren und Passagierung der Zellen.....	23
2.1.10.7 Bestimmung der Lebendzellzahl und Vitalitätsprüfung	24
2.1.11 <i>In-vitro</i> Besiedlung der klappentragenden Stents	24
2.1.11.1 statische Besiedlung mit glatten Muskelzellen.....	24
2.1.11.2 Dynamische Bioreaktorkultur	25
2.1.11.3 Endothelzellbesiedlung	25
2.1.11.4 Der Bioreaktor	26
2.1.12 Histologie von dezellularisierten und besiedelten Klappensegeln	26
2.2 <i>In-vitro</i> Untersuchungen der klappentragenden Stents	27
2.2.1 Kathetertest	27
2.2.2 Expansionsfähigkeit.....	27
2.2.3 Suffizienztest mit physiologischer Kochsalzlösung	27
2.2.4 Funktionstest am Kreislaufmodell.....	28
2.2.5 Mikrobiologische Abstriche	28
2.3 Der Einsatz am ovinen Modell.....	28
2.3.1 Applikationsverfahren	29
2.3.2 Versuchsdurchführung.....	30
2.3.2.1 Anästhesie	30
2.3.2.2 Implantationsvorbereitung	30
2.3.2.3 Stent-Implantation	31
2.3.3 Untersuchung der letalen Komplikationen	33
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Die Herstellung der klappentragenden Stents	34
3.1.1 Präparationsversuche	34
3.1.2 Untersuchung der Prototypen	34
3.1.3 Die Dezellularisierung mit Trypsin/EDTA.....	35
3.1.3.1 Dezellularisierung mit verschiedenen Inkubationszeiten	36
3.1.3.2 Histologische Untersuchung eines dezellularisierten Klappensegels.....	36
3.1.4 Zellgewinnung und Kultivierung der Primärzellen	36
3.1.4.1 Glatte Muskelzellen (SMC)	37

3.1.4.2 Endothelzellen	37
3.1.4.2 Vitalitätsprüfung und Zellzählung	38
3.1.5 Die <i>in vitro</i> -Besiedlung.....	38
3.1.6 Zeitplan für die Herstellung eines Tissue Engineerten klappentragenden Stents..	39
3.2 <i>In vitro</i>-Untersuchungen der klappentragenden Stents	40
3.2.1 Makroskopische Beurteilung	42
3.2.2 Expansionsfähigkeit.....	43
3.2.3 Suffizienztest mit physiologischer Kochsalzlösung	45
3.2.4 Funktionstest am Kreislaufmodell	46
3.2.5 Mikrobiologische Abstriche	47
3.3 Einsatz am ovinen Modell	47
3.3.1 Die Implantation	34
3.3.2 Untersuchung der letalen Komplikationen	34
4 Diskussion.....	48
4.1 Die Herstellung der klappentragenden Stents	48
4.1.1 Der selbsexpandierende Nitinol Stent.....	48
4.1.2 Der ovine Dünndarm	49
4.1.3 Die porcine Pulmonalklappe.....	50
4.1.4 Bewertung der Prototypen	57
4.1.5 Herstellung eines Klappengerüsts für eine <i>in vitro</i> -Besiedlung oder <i>in vivo</i> - Rebesiedlung.....	51
4.1.6 Die Dezellularisierung	52
4.1.7 Gewinnung und Kultivierung der Primärzellen.....	54
4.1.8 Die <i>in vitro</i> -Besiedlung.....	55
4.1.9 Bewertung des gesamten Entwicklungsprozesses.....	56
4.1.10 Zeitplan für die Herstellung Tissue engineerter Herzklappen	56
4.2 <i>In vitro</i>-Untersuchung der klappentragenden Stents	57
4.2.1 Makroskopische Beurteilung	57
4.2.2 Expansionsfähigkeit.....	58
4.2.3 Suffizienztest mit physiologischer Kochsalzlösung	58
4.2.4 Funktionstest am Kreislaufmodell	59
4.2.5 Mikrobiologische Abstriche	59
4.3 Der Einsatz am ovinen Modell.....	59

4.3.1 Das Tiermodell	59
4.3.2 Untersuchung der letalen Komplikationen	60
4.4 Einschränkungen der Studie.....	61
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....	61
5 Zusammenfassung	63
6 Literaturverzeichnis	65
7 Danksagungen	76
8 Lebenslauf	77

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
EC	Endothelzellen
ECM	extrazelluläre Matrix
EKG	Elektrokardiogramm
FA	Firma
FB	Fibroblasten
h	Stunde
H&E Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
Hz	Hertz
I.D.	Innendurchmesser
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
LDL	low density lipoprotein
Lsg.	Lösung
m	Meter
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ms	Millisekunde
NaCl	Natrium-Chlorid
OP	Operation
PBS	Phosphate buffered saline
s	Sekunde
s.	siehe
SD	Standardabweichung

SMC	glatte Muskelzellen (smooth muscle cells)
Tab.	Tabelle
TE	Tissue Engineering
TE-Klappe	Tissue engineerete Herzklappe
tG	transvalvulärer Gradient
U	Umdrehungen

1 Einleitung

1.1 Die Herzklappen

Das menschliche Herz hat vier Herzklappen: die Pulmonal- und die Trikuspidalklappe im rechten sowie die Aorten- und die Mitralklappe im linken Herzen (Abb. 1). Während die sogenannten Segelklappen (Mitralklappe und Trikuspidalklappe) die Vorhöfe und Kammern des linken bzw. rechten Herzens voneinander trennen, verhindern die "Taschenklappen" (Aorten- und Pulmonalklappe) den Rückfluss des Blutes aus der Körper- bzw. der Lungenschlagader in die Herzkammern. Die vier Herzklappen dienen als Ventile, die dem Blut im Wechsel von Kontraktion und Erschlaffung der Herzkammern die Strömungsrichtung vorgeben. Sind die Klappen verengt (Stenose) oder schließen sie unzureichend (Insuffizienz) wird der Herzmuskel überlastet und zunehmend geschädigt, so dass am Ende der Organismus nicht mehr ausreichend mit Blut versorgt werden kann.

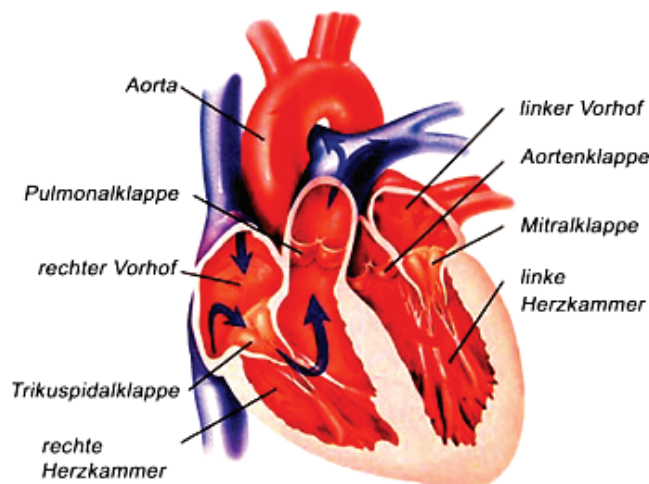


Abb. 1: Schnitt durch ein menschliches Herz (aus www.msd.de)

1.2 Erkrankungen der Herzklappen

1.2.1 Ätiologie und Epidemiologie

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind weltweit nach wie vor die führenden Morbiditäts- und Mortalitätsfaktoren. Pathologische Veränderungen der Herzklappen stellen dabei eine bedeutende Untergruppe dar (1). In Deutschland leiden ca. 200.000 Menschen unter einem Herzklappenfehler. Die Zahl der Herzklappen-Operationen hat sich in Deutschland von 7400 im Jahre 1990 auf über 16.800 im Jahr 2003 mehr als verdoppelt (1). Herzklappenerkrankungen können angeboren oder erworben sein; durch eine Infektion, durch Verkalkung oder in Folge eines Herzinfarktes kann es zu einer Schädigung der Herzklappen oder deren Halteapparat (Papillarmuskel) kommen.

In früheren Jahren führte überwiegend das rheumatische Fieber zur Endokarditis mit nachfolgenden Herzklappenerkrankungen. Inzwischen ist das rheumatische Fieber durch den Einsatz von Antibiotika deutlich rückläufig. Die häufigsten Ursachen für Herzklappenerkrankungen sind heute bakterielle Herzinnenhautentzündungen (Endokarditiden), Herzinfarktfolgen, angeborene Gewebeschwächen und vor allem degenerative Formveränderungen. Die Funktionsunfähigkeit entwickelt sich meist im Laufe von Jahrzehnten und betrifft daher häufig ältere Menschen. Vor allem die in den westlichen Industrieländern steigende Lebenserwartung führte zu einem Anstieg der degenerativen Herzklappenerkrankungen. Nach einer Studie von Lindroos et al. (2) leiden ca. 13 % der über 75 Jährigen unter einer schwerwiegenden Verkalkung der Aortenklappe. Zu der Entstehung degenerativer Herzklappenerkrankungen tragen insbesondere folgende Risikofaktoren bei: Rauchen, Hypertonus, Diabetes mellitus, männliches Geschlecht, Lipoprotein-A-Ablagerungen und ein hoher LDL-Cholesterinspiegel (3;4). Weitere, vor allem in den letzten zwei Jahrzehnten ansteigende neuere Herzklappenerkrankungen spielen zunehmend eine Rolle. Sie beruhen auf Infektionskrankheiten wie Aids (5), auf der chronischen Einnahme von Medikamenten wie Appetitzügler (6) oder Ergotamine (7) und auf neuen Typen von idopathischen Erkrankungen wie das Antiphospholipid-Syndrom (8).

1.2.2 Topographie der Herzklappenerkrankungen

Durch die höheren Drücke und die stärkere mechanische Belastung zeigen sich Dysfunktionen der Klappen deutlich häufiger an dem linken als an dem rechten Herzen. Die Verkalkung der Aortenklappe mit konsekutiver Stenose ist hier die häufigste Veränderung (1;2;9). Aortenstenosen und kombinierte Aortenvitien stellen etwa 50 % der Herzklappenerkrankungen dar (10). Es folgen Aorteninsuffizienzen und degenerative Veränderungen der Mitralklappe, meist als Mitralstenosen oder kombinierte Mitralvitien. Erkrankungen der Pulmonal- oder Trikuspidalklappe sind selten und treten meist im Rahmen einer kongenitalen Anomalie (angeborenen Herzfehlers), wie z.B. der Fallotschen Tetralogie, auf.

1.2.3 Symptome und Diagnostik

Allgemeine Symptome einer Klappenerkrankung sind Leistungsminderung, Luftnot, Herzrhythmusstörungen, Angina pectoris sowie temporäre Bewusstseinsverluste. Diese Symptome treten als typische Folge einer Pumpschwäche des Herzens oder eines Blutrückstaus vor dem Herzen auf. Mit Ausnahme der herzinfarktbedingten Klappenfehlfunktionen entwickeln sich Herzklappenschäden meist schleichend. Das Herz ist

dabei einer langsam zunehmenden Belastung ausgesetzt, an die es sich nur bis zu einem gewissen Punkt anpassen kann.

Um einen Herzklappenfehler zu diagnostizieren, stehen verschiedene Untersuchungen zur Verfügung. Mit einem Stethoskop lässt sich relativ einfach feststellen, ob die Herztöne verändert sind. Dann folgen weitere Untersuchungen wie

- **Elektrokardiogramm (EKG)** deutet auf Herzrhythmusstörungen oder eine kompensatorische Größenzunahme als Folge eines Herzklappenfehlers hin.
- **Ultraschalluntersuchung (Echokardiogramm)** erlaubt die Beurteilung des Klappenfehlers selbst und der Folgen, der Herzgröße und -funktion. Die Platzierung der Ultraschallsonde in der Speiseröhre (transösophageale Echokardiographie) erlaubt eine noch bessere Beurteilung des Klappenfehlers.
- **Röntgen** macht die Auswirkungen einer Herzmuskelschwäche infolge eines Klappenfehlers sichtbar.
- **Herzkatheteruntersuchung** dient der genauen Beurteilung der Herzleistung und dem Nachweis von Verengungen der Herzkranzgefäße. Hierbei kann auch eine koronare Herzkrankheit als Ursache für die Beschwerden ausgeschlossen oder bestätigt werden.

1.2.4 Therapiemöglichkeiten

Die Therapie hängt vom Schweregrad des Klappenfehlers ab. Leichte Klappenfehler müssen häufig nicht operiert werden. Die Atemnot kann medikamentös behandelt werden. Unabhängig jedoch vom Schweregrad ist die Einnahme von Antibiotika vor bestimmten Eingriffen (zum Beispiel Zahneingriffe, Spiegelungen usw.). Hierdurch soll eine Herzklappenentzündung (Endokarditis) vermieden werden. Reichen zur Behandlung der Herzinsuffizienz körperliche Schonung und Medikamente nicht aus, ist die Funktionsfähigkeit der betroffenen Klappe durch eine Operation wieder herzustellen. Je nach befallener Klappe, Untersuchungsbefund und Ausprägung des Herzklappenfehlers werden unterschiedliche Behandlungsverfahren angewendet. In der Regel wird eine chirurgische Wiederherstellung der anatomischen Struktur der Herzklappe angestrebt. Erst wenn dies nicht mehr möglich ist, wird die Implantation einer Klappenprothese durchgeführt. Ist keine Operation möglich, können Klappenverengungen im Rahmen der Herzkatheter-Untersuchung gesprengt werden. Der chirurgische Eingriff ist jedoch in den meisten Fällen der einzig mögliche kurative Behandlungsansatz bei symptomatischen Klappenfehlern und auch solchen, die eine linksventrikuläre Dysfunktion verursachen (11).

1.3 Herzklappenersatz

In den sechziger Jahren fanden die ersten erfolgreichen Klappenimplantationen statt. Inzwischen wurden die künstlichen Herzklappen so erfolgreich weiterentwickelt, dass das Einsetzen heute einen Routineeingriff darstellt. Grundsätzlich stehen mechanische und biologische Klappentypen zur Verfügung (Abb.2). Bei der Wahl zwischen diesen Klappentypen spielen verschiedene klappenbedingte Morbiditätsfaktoren wie Thromboembolierisiko, antikoagulationbedingte Blutungen, Prothesenendokarditis, persistierende Linksherzhypertrophie und paravalvuläre Leckbildung eine entscheidende Rolle. Auch andere Faktoren, wie vor allem das Alter, die Lebensqualität unter Antikoagulations-Therapie, die Leistungsfähigkeit und die Notwendigkeit von Reoperationen sind zu berücksichtigen.

55 % aller weltweit implantierten Klappen sind mechanische, die restlichen 45 % biologische Klappen (12). Bei über 70jährigen zeigten die biologischen gegenüber den mechanischen Klappen Vorteile bezüglich der antikoagulationsbedingten Morbidität und Mortalität (12). Im Gegensatz dazu konnte bei Patienten im Alter von 55 bis 65 Jahren eine höhere klappenbedingte Komplikationsrate nach der Implantation von biologischen Klappen in Aortenposition beobachtet werden (13).

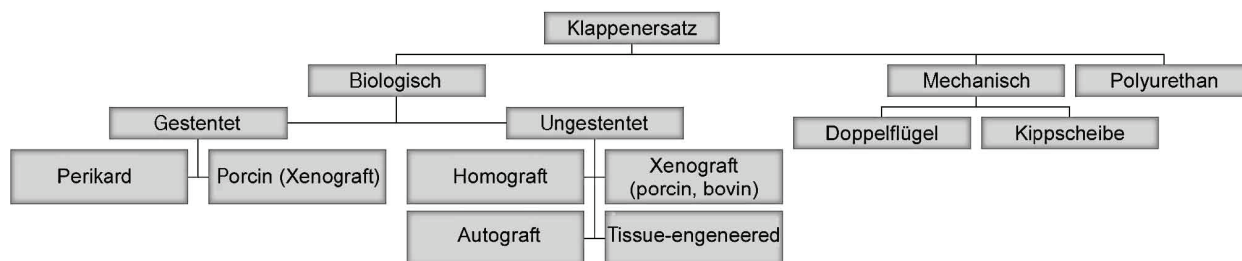


Abb. 2: Übersicht über die verschiedenen Materialien zum Klappenersatz

1.3.1 Mechanische Prothesen

1960 wurde die erste mechanische Prothese in Mitralposition von Starr und Edwards eingesetzt. Im gleichen Jahr berichtete Harken über die erste Implantation einer Kugelventilprothese als Klappenersatz bei Aorteninsuffizienz (14;15).

Seit dieser Zeit haben sich die mechanischen Klappenprothesen in Bezug auf ihre Haltbarkeit und Funktion kontinuierlich verbessert. Als Goldstandard kommt der mechanische Klappenersatz heute vorwiegend in der Altersgruppe zwischen 50 und 65 Jahren zum Einsatz. Von Vorteil ist die praktisch unbegrenzte Haltbarkeit mechanischer Prothesen. Sie sind jedoch auch thrombogen, so dass eine lebenslange Antikoagulation notwendig ist. Die Antikoagulation reduziert das Risiko der Klappenthrombose und damit die Embolisation von

thrombotischem Material, jedoch steigt damit auch das Blutungsrisiko für die Patienten (16;17). Hinzu kommt das erhöhte Risiko einer Prothesenendokarditis. Auch das bei mechanischen Klappen auftretende Klappengeräusch, meist als Klappenklick bezeichnet, stellt für viele Patienten ein psychologisches Problem dar. Zwei Bauarten haben sich seit der Etablierung in den 70er Jahren im Wesentlichen durchgesetzt (18;19); die Doppelflügelprothese (entwickelt von der FA St. Jude Medical) und die Kippscheibenprothese (entwickelt von der FA Björk-Shiley). Die Wahl zwischen diesen beiden Modellen fällt aufgrund der Hämodynamik und insgesamt umfangreicherer Erfahrungen meist zugunsten der Doppelflügelklappe aus (20-22). Doch auch die Kippscheibenprothese zeigt Vorzüge wie z.B. eine geringere Rate an Klappenthrombosen und Mikroembolisationen auf (23;24).

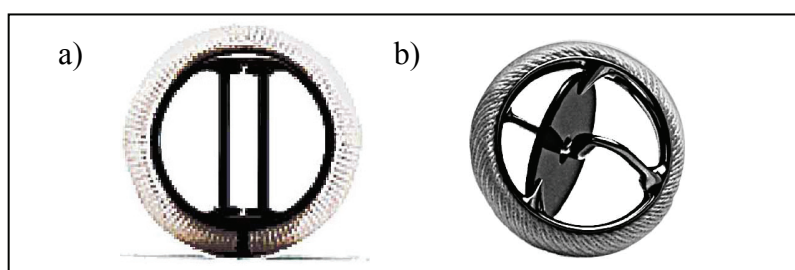


Abb. 3: Mechanische Klappenprothesen: a) Doppelflügel b) Kippscheibe

1.3.2 Biologische Prothesen

Biologische Klappenprothesen sind weniger thrombogen und benötigen keine Langzeitantikoagulation, jedoch ist ihre Haltbarkeit deutlich geringer als die der mechanischen Prothesen. Patienten zwischen 65 und 70 Jahre profitieren am meisten von einem biologischen Klappenersatz (12). Speziell bei Kindern und jungen Erwachsenen lässt sich jedoch eine beschleunigte Degeneration beobachten, die die erneute Implantation einer Klappe erforderlich macht (25). Generell unterscheidet man zum einen Homografts (menschliche Herzklappen) und glutaraldehydfixierte Xenografts (Prothesen, deren Segel aus tierischem Material bestehen) und zum anderen Bioprothesen mit und ohne Gerüst. Jede einzelne dieser Prothesenarten hat bestimmte Limitationen, welche mit charakteristischen Komplikationen und Einschränkungen für die Patienten verbunden sind.

Bei Homografts handelt es sich um menschliche Herzklappen, die entweder von verstorbenen Spendern oder aus explantierten Empfängerherzen im Rahmen einer Herztransplantation stammen (Abb. 4a). 1965 erfolgte die erste Implantation einer menschlichen Aortenklappe (26). Homografts sind jedoch nur in sehr limitierter Anzahl und Größe verfügbar. Auch konnte bei Kindern eine immunologische Reaktion nachgewiesen werden (27).

Herzklappen tierischen Ursprungs (Xenografts) stehen dagegen in ausreichender Menge und Größe zur Verfügung und werden sehr häufig verwendet. Gebräuchlich sind vor allem native Schweineherzklappen oder Klappen, die aus Rinderherzbeuteln (Rinderperikard) hergestellt werden. Die erste porcine Prothese wurde 1965 beim Menschen verpflanzt (28). Zu dieser Zeit waren noch alle Xenografts auf ein Klappengerüst aus Kunststoff genäht (gestentete Bioklappen, Abb. 4b). Ein solches Gerüst besteht aus flexiblen Pfosten und einem äußeren Ring aus Dacron- oder Teflونغewebe. Der Stent ermöglicht eine einfachere Implantation, hat jedoch den Nachteil, dass er die Öffnungsfläche verkleinert und somit die Leistungsfähigkeit der Klappe vermindert.

Seit 1987 gibt es zusätzlich gerüstfreie Xenograft-Bioprothesen (ungestentete biologische Prothesen, Abb. 4c). Porcine Herzklappen, die hier verwendet werden, sind in ihrer Größe und Anatomie den menschlichen Homografts am ähnlichsten (29). Bei ihnen entspricht die Öffnungsfläche nahezu der der menschlichen Herzklappen. Ein weiterer Vorteil gerüstfreier Klappen ist die im allgemeinen sehr gute Blutflusseigenschaft (30-32). Allerdings müssen diese Klappen ebenso wie Homografts mit zwei Nahtreihen eingenäht werden und erfordern somit eine deutlich anspruchsvollere chirurgische Technik.

Aufgrund der erwähnten aufwendigen Implantation und der damit verbundenen langen Ischämiezeit des Herzens werden ungestentete Prothesen im besonderen bei Risikopatienten eher zurückhaltend implantiert (33).

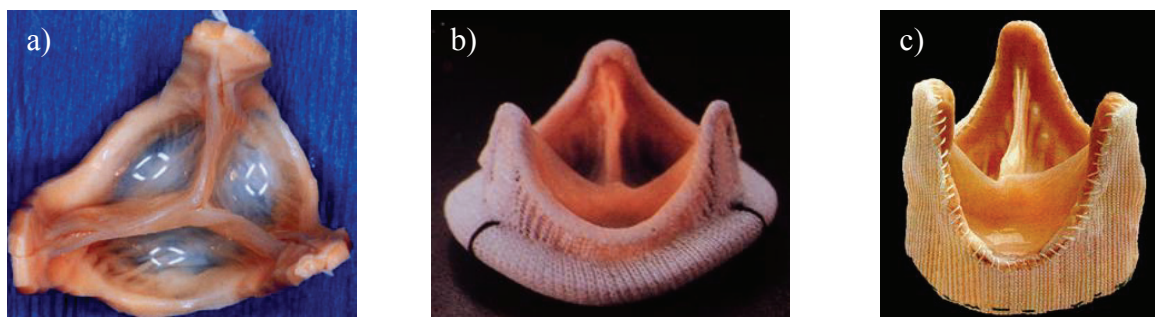


Abb. 4. Biologische Herzklappen a) Homograft, b) gestentete Xenograft, c) ungestentete Xenograft

Besonders bei dem Aortenklappenersatz bei jüngeren Patienten hat sich ein weiterer Klappentyp durchgesetzt. So ist der hier vorher oft verwendete Homograft heute weitgehend durch den pulmonalen Autograft (Ross-Operation) abgelöst worden (34;35). Hierbei wird die patienteneigene Pulmonalklappe exzidiert und in Aortenposition implantiert. Die rechtsventrikuläre Ausflussbahn wird anschließend durch einen Homograft rekonstruiert. Die wesentlichen Vorteile dieser Autografts sind niedrigstes Thromboembolie- und Endokarditisrisiko sowie eine optimale Hämodynamik, der Verzicht auf eine Antikoagulationstherapie und eine Resistenz gegen Infektionen. Durch das Wachstumspotential der vitalen patienteneigenen Klappe ist dieser Klappentyp ganz

besonders für Kinder und Jugendliche geeignet. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die ausgetauschte Klappe weder Regenerations- noch Wachstumspotenzial besitzt. Nachteilig sind auch die wie bei Homografts mögliche Degeneration und zusätzlich eine durch den höheren systemischen Blutdruck bewirkte Dilatationsneigung der Pulmonalwurzel in Aortenposition. Auch hier wird wegen der sehr komplexen Operation der Einsatz vorwiegend bei Patienten im Alter bis zu 50 Jahren mit guter Myokardfunktion empfohlen.

Ein neuer viel versprechender Ansatz der Klappenrekonstruktion durch Gewebezücht (Tissue Engineering) befindet sich in den ersten Entwicklungsstadien.

1.4 Die ideale Herzklappe

Trotz stetiger Verbesserung der klappenspezifischen Parameter konnte der ideale Klappenersatz noch nicht entwickelt werden. 1976 stellte Roberts einen Katalog auf, dessen Punkte die Kriterien einer idealen Klappenprothese erfüllen sollen (36). Bis heute haben diese Kriterien Gültigkeit. Folgende Kriterien wurden formuliert:

Die ideale Herzkappenprothese

- besitzt gute hämodynamische Charakteristika, d.h. sie darf nicht obstruierend wirken, das physiologische Flussmuster soll erhalten bleiben und sie muss wirkungsvoll schließen
- ist nicht thrombogen, eine Antikoagulation ist nicht notwendig
- ist unbegrenzt haltbar, d.h. es findet keine Degeneration und kein Verschleiß statt
- verursacht keine signifikanten Veränderungen an Bestandteilen des Blutes, d.h. keine Zunahme der Hämolyseparameter
- ist problemlos implantierbar
- darf den Patienten nicht beeinträchtigen

Zusätzlich sollte eine Herzklappe idealer Weise die Fähigkeit besitzen mit zu wachsen. Besonders die für Kinder resultierende Notwendigkeit wiederholter Operationen könnte so umgangen werden. Auch sollte eine ideale Klappe keine immunologische Barriere darstellen. Keine der gegenwärtig verwendeten Klappenmodelle kann sämtliche Kriterien erfüllen. Der junge Forschungsbereich Tissue Engineering stellt einen viel versprechenden Ansatz dar, eine solche ideale Herzklappe herzustellen.

1.5 Tissue Engineering und Guided Tissue Regeneration von Herzklappen

Tissue Engineering ist ein interdisziplinärer Forschungsbereich, der Ingenieurwissenschaften mit zellbiologischen Fachbereichen verbindet. Ziel ist es, vitales autologes Gewebe zur Wiederherstellung, zum Erhalt oder zur Verbesserung von erkranktem oder zerstörtem

Gewebe und Organen zu schaffen. Für die Entwicklung neuartiger Klappentypen eröffnet dieses Prinzip viel versprechende Möglichkeiten. In Form der zu ersetzenden Herzklappe soll so vitales und funktionelles Gewebe, basierend auf einem biokompatiblen und resorbierbaren Grundgerüst hergestellt werden (37;38).

Das Grundgerüst wird zu diesem Zweck mit autologen Zellen, zum Beispiel mit von Venen- oder Arterienbiopsien gewonnenen Gefäßwandzellen, wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen, besiedelt. Während die Zellen extrazelluläre Matrix produzieren und dem Gewebe so zunehmende Struktur und Stabilität verleihen, wird das Grundgerüst schrittweise abgebaut. Nach kompletter Resorption verbleibt einzig das neu geschaffene funktionsfähige Zell-Matrix-Gewebe. Die Klappe würde so ein Wachstums- und Regenerationspotential besitzen. Die zurzeit verfolgten Konzepte unter Verwendung von biodegradablen Polymeren oder azellulärer Trägergrundstruktur (xenogene Matrix) befinden sich in präklinischen Entwicklungsstadien.

Unter den Bereich Tissue Engineering in der Klappenchirurgie fällt auch das Konzept des Guided Tissue Regeneration. Im Gegensatz zu einer *in vitro*-Besiedlung wird hier die autologe Besiedlung erst *in vivo* angestrebt (39;40).

Shinóka et al. beschrieben 1995 erstmals den Ersatz eines Pulmonalklappensegels im Schaf durch ein Konstrukt aus dem biodegradablen Polymerkunststoff Polyglykolsäure, welches zuvor *in vitro* mit autologen Gefäßwandzellen besiedelt worden war (41). Andere Arbeitsgruppen verwenden seitdem ebenfalls biologisch abbaubare künstliche Gerüste zur Beschichtung mit Endothelzellen (42;43). Jedoch bereitet es bis heute Schwierigkeiten, diese Gerüste stabil mit Endothelzellen zu beschichten (42;44;45).

Als Gerüst für eine Zell-Beschichtung können biologische Materialien eine Alternative zu den künstlichen Materialien darstellen (46). Bei diesem Ansatz werden Herzklappen (Xenografts/Homografts) verwendet, welche enzymatisch oder mit verschiedenen Detergentien dezellularisiert worden sind (47). Diese dezellularisierten Klappen werden anschließend entweder *in vitro* mit Zellen beschichtet oder eine Rebesiedlung wird *in vivo* nach Implantation angestrebt (47). Eine Studie von Steinhoff et al. vergleicht die Ergebnisse einer *in vitro*-Besiedlung mit denen einer *in vivo*-Rebesiedlung. Die Klappen wurden jeweils für drei Monate als Pulmonalklappenersatz bei Schafen implantiert. Die *in vitro*-Beschichtung mit autologen Myofibroblasten (SMC und FB) und Endothelzellen zeigte nach Explantation in 100 % der Fälle einen konfluenten Zellrasen. Die *in vivo*-Rebesiedlung der Klappen zeigte hingegen nur vereinzelte Bereiche mit Myofibroblasten und Endothelzellen (48). Gegensätzliche Ergebnisse zeigte die ähnlich aufgebaute Studie von Leyh et al., in der an

Schafen *in vivo* rebesiedelte und *in vitro* besiedelte Pulmonalklappen verglichen wurden. Nach sechs bzw. zwölf Monaten wurden sie dann explantiert und miteinander verglichen. Bei den *in vitro* besiedelten Klappen zeigte sich histologisch eine pathologisch veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, sowie eine inhomogene Besiedlung mit Endothelzellen. Demgegenüber wiesen die *in vivo* rebesiedelten Klappen eine normal aufgebaute Extrazellulärmatrix sowie einen konfluenten gleichmäßigen endothelialen Zellrasen auf (49).

Die meisten Untersuchungen werden derzeit in der Pulmonalzirkulation getestet. Aufgrund der hohen Druckverhältnisse im großen Kreislauf, ist die Implantation einer Tissue engineeringen Aortenklappe bisher nicht zufrieden stellend gelungen (45).

1.6 Perkutaner Herzklappenersatz

Neben der Entwicklung neuer Klappentypen werden alternative Implantationsmethoden untersucht. Die Chirurgie bleibt immer noch die momentan einzige ernsthafte Option in der Behandlung einer stenotischen oder insuffizienten Klappenerkrankung. In einigen experimentellen und klinischen Studien wurde jedoch die technische Durchführbarkeit der Klappenimplantation mit entferntem Zugang aufgezeigt (50-64). Jüngste Fortschritte in der interventionellen Kardiologie und in der Herzchirurgie haben das Augenmerk auf den aufkommenden perkutanen Klappenersatz gerichtet. Hierbei wird eine faltbare Klappe in einem expandierenden Stent befestigt und perkutan, d.h. über ein peripheres Gefäß, mittels eines Katheters implantiert. 1992 haben Andersen et al. (50) und Pavcnik et al. (65) das Konzept einer in einen Stent eingebauten Klappe beschrieben. Seitdem hat das Interesse an der neuen Technik stark zugenommen. Die erste erfolgreiche perkutane Implantation an Pulmonalposition einer in einem Stent montierten Klappe beim Menschen wurde 2000 durch Bonhoeffer et al. durchgeführt (52). Zwei Jahre später erfolgte die erste perkutane Implantation eines klappentragenden Stents durch Cribier et al., um eine schwer erkrankte Aortenklappe zu ersetzen (62). Der Fernzugang hat seine Tauglichkeit bewiesen, jedoch birgt der perkutane Klappenersatz noch viele Probleme. Das Komplikationspotential für die Einführung von großen Klappendurchmessern ist hoch; Gefäßruptur, Dissektion, Pseudoaneurysma, Blutung, Stenose sowie Thromben können entstehen. Durch den großen Abstand zwischen Zugang und Zielort ist eine präzise Platzierung der Klappe sehr mühsam. Dazu kommt, dass die geringe Größe des Zugangsgefäßes die Größe der zu implantierenden Klappe limitiert. Weitere Schwierigkeiten bei dem perkutanen Ersatz der Aortenklappe bereiten die Position der Koronaröffnung, die enge Beziehung zu dem vorderen Mitralklappensegel sowie die begrenzten Möglichkeiten, die erkrankte Klappe zu entfernen.

Bei einer Sterblichkeitsrate von unter 4 % zeigt sich die konventionelle chirurgische Herzklappenoperation als eine sehr erfolgreiche Methode (66). An diesem Standard müssen sich alle alternativen, interventionellen Verfahren wie der perkutane Klappenersatz messen (67). Doch sind auch der Aufwand einer konventionellen chirurgischen Operation mit offenem Thorax und dem Einsatz der Herz-Lungen Maschine und die mit der Operation verbundenen zahlreichen Risiken zu beachten. Für Risikopatienten ist eine konventionelle Operation selten vertretbar, auch wenn sie von einem Klappenersatz profitieren würden. Ein Bedarf an alternativen Methoden zur chirurgischen Intervention ist somit gegeben. Besonders die ständig steigende Lebenserwartung in den westlichen Industrienationen und der damit verbundene Anstieg degenerativer Veränderungen lassen risikoärmere, wenig invasive Verfahren an Bedeutung gewinnen (68). Auch für die Behandlung kongenitaler Herzklappenerkrankungen, die häufig mit einer Stenose der Pulmonalklappe assoziiert sind, könnte der perkutane Klappenersatz eine sinnvolle Alternative darstellen. Besonders für spätere Reoperationen, die dort häufig notwendig sind, würde sich das Verfahren anbieten (69). Weitere Vorteile der perkutanen Implantation bestehen vor allem in den guten kosmetischen Ergebnissen und auch in den verminderten Wundheilungsstörungen, so dass einer Entzündung oder Instabilität des Brustbeins vorgebeugt werden kann. Nicht zuletzt wäre diese Art von Klappenersatz auch aus ökonomischer Sicht weitaus weniger aufwendig. Die ersten erfolgreichen Implantationen von Pulmonal- und Aortenklappen durch perkutane Verfahren zeigen die Möglichkeit der erfolgreichen Etablierung, die einer großen Anzahl von Patienten von Nutzen sein könnte (50;63;69).

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Die besondere Herausforderung, der sich diese Studie stellt, ist die Zusammenführung der noch jungen Forschungsbereiche des Tissue Engineering und des perkutanen Klappenersatzes. Seit 1997 beschäftigt sich die Arbeitsgruppe der Klinik für Herz und Gefäßchirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit dem Thema „perkutaner Klappenersatz“. Studien zum perkutanen Aortenklappenersatz befinden sich in einem frühen klinischen Stadium (63;67;70-73). Der perkutane Pulmonalklappenersatz zeigt bereits größere Fortschritte (74-78). Hierbei wurden bovine Jugularvenenklappen in einen selbstexpandierenden Stent genäht und in einem ovinen Großtiermodell über die Femoralarterie an Pulmonalisposition implantiert. In einer Weiterentwicklung dieser Versuche sollen nun Tissue engineerte Herzklappen entwickelt und in das Modell integriert werden.

Ziel dieser Gesamtstudie unter PD Dr. Lutter, Dr. Attmann (Universität Kiel) und PD Dr. U. Stock (Universität Tübingen, vormals Berlin und Jena) ist es, einen geeigneten klappentragenden Stent zu konstruieren und *in vivo* und *in vitro* gewonnene Ergebnisse wie Entwicklung, Anwendbarkeit, Funktion, Suffizienz, hämodynamische Parameter, geeignete Kathetersysteme, histologische Auswertungen und das Migrationsverhalten zu evaluieren. Weitere Untersuchungen, wie der Vergleich zwischen dezellularisierten klappentragenden Stents, die *in vivo* rebesiedelt werden, und *in vitro* besiedelten klappentragenden Stents, sollen durchgeführt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Tissue engineerten klappentragenden Stent auf der Basis eines dezellularisierten Klappengerüsts herzustellen, der sich für den perkutanen Einsatz eignet. Ein reproduzierbarer Herstellungsprozess soll eingeführt werden. Folgende Fragen sind hier im Einzelnen zu klären:

- Welches Rohmaterial kann für die klappentragenden Stents verwendet werden?
- Wie lassen sich porcine Herzklappen präparieren und in einen Nitinolstent einbringen, um sie mittels eines Katheters applizieren zu können?
- Wie kann die Klappe während der Komprimierung in einem Katheter geschützt werden?
- Wie lassen sich autologe Zellen gewinnen und kultivieren?
- Wie kann der klappentragende Stent dezellularisiert und besiedelt werden?
- Wie lange dauert die Herstellung eines klappentragenden Stents von der Präparation bis zu der Besiedlung?

Im Besonderen wird im Rahmen dieser Arbeit der gesamte Produktionsprozess explizit beschrieben. Weiterhin werden die Ergebnisse anhand von zahlreichen Präparationsversuchen und Prototypen sowie anhand von 24 für die Implantation gefertigten klappentragenden Stents (22 dezellularisierte für *in vivo*-Rebesiedlung und 2 *in vitro* besiedelte Stents) diskutiert. Durch verschiedene *in vitro*-Untersuchungen wird eine Bewertung der Stents vorgenommen. Exemplarisch werden zusätzlich die Funktion und mechanische Belastbarkeit eines klappentragenden Stents in einer pulsativen Strömungsanlage (Kreislaufmodell) untersucht. Des Weiteren wird ein konkreter Zeitplan für den gesamten Herstellungsprozess eines Tissue engineerten Stents bis zum Zeitpunkt der Implantation entworfen, um eine effiziente Versuchsdurchführung zu gewährleisten. Um ergänzend die Anwendbarkeit der klappentragenden Stents und akute Auswirkungen der Stent-Applikation *in vivo* zu bewerten, werden die nach der Implantation verstorbenen Versuchstiere auf ihre Todesursache hin untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Die Herstellung der klappentragenden Stents

Für die Herstellung der klappentragenden Stents wurden Nitinol-Stents, oviner Dünndarm und Schweineherzklappen als Grundbausteine verwendet. Der Herstellungsprozess von dezellularisierten Stents, die *in vivo* rebesiedelt werden sollten, umfasst die Punkte 2.1.1 bis 2.1.9. Die Herstellung von Stents, die *in vitro* mit glatten Muskelzellen (SMC) und Endothelzellen (EC) besiedelt wurden, umfasst die Punkte 2.1.1 bis 2.1.11. Die für die Herstellung nötigen Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Geräte werden in Übersichtstabellen (2.1.2 - 2.1.4) aufgeführt.

Insgesamt wurden 40 klappentragende Stents hergestellt: 10 Prototypen, 6 für Dezellularisierungs- und Besiedlungsversuche, 24 für *in vitro*-Untersuchungen und den Einsatz am Tiermodell.

2.1.1 Versuchstiere

Die Versuche fanden an Schafen beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 22,5 – 43 kg statt. Vor dem Eingriff wurden die Tiere für 24 h unter Nahrungskarenz und Wasser *ad libitum* gehalten.

Das tierexperimentelle Vorgehen entsprach den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes und wurde von dem Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig Holstein und Herrn Prof. Dr. I. Reetz, dem Tierschutzbeauftragten der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel, am 28. Juli 2003 genehmigt.

2.1.2 Reagenzien und Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Amphotericin B	X-Gen	Apotheke, UK S-H
Aqua bidest	verschiedene	Apotheke, UK S-H
Betaisodonna Lösung	Mundipharma GmbH	Apotheke, UK S-H
Collagenase A	Roche	10 35 86
Einfrüermedium Cryo SFM (125 ml)	Promocell	C 299
Ethanol (30/50/70/96 %)	verschiedene	Apotheke, UK S-H
FCS (500ml) Foetales Kälberserum	Biochrom AG / Berlin	S 0115
Gelatine Typ A, powder, cell culture tested	Sigma	G1890
Gentamycin 40 mg	Merck	Apotheke, UK S-H
Growthfactor 25 µg rhFGF = basic fibroblast growth factor, human recombinant	Promega	G 5071

HANK` s Solution Hank` s w/o Phenol Red	Biochrom AG / Berlin	L 2035
Metronidazol 500 mg	Fresenius Kabi	Apotheke, UK S-H
NaCl 0,9%	verschiedene	Apotheke, UK S-H
Penicillin/Streptomycin 10.000 U / 10.000 µg/ml	Biochrom AG / Berlin	A2213
Phosphate Buffered Saline: PBS mit Calcium und Magnesium, flüssig	Gibco	14040-174
Piperacillin 1 g	Ratiopharm	Apotheke, UK S-H
Staphylex 1 g	GlaxoSmithKline	Apotheke, UK S-H
Trypsin/EDTA (für Zellkultur): Trypsin/EDTA (1x)	Gibco	25300-096
Trypsin-EDTA Solution 0,05 % / 0,02 % in PBS w/o Ca / Mg	Biochrom AG / Berlin	L2143
Zellkulturmedium (500 ml) Dulbeccos modified eagle medium (1x) liquid, High glucose	Gibco	41966-052

2.1.3 Geräte

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

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Einmalartikel, steril und unsteril

Bezeichnung	Hersteller
Einfrierröhrchen (2ml)	Nunc GmbH
Falcon Röhrchen 50 ml	BD Biosciences
Falcon Röhrchen 15 ml	BD Biosciences
24-Lochplatten	Greiner Bio-one
6-Lochplatten	Greiner Bio-one
Petrischalen	Greiner Bio-one
Pipetten 5, 10, 25 ml	Eppendorf
Pipetten 60, 500, 1000 ul	Eppendorf

Zellkulturflaschen 25/75 cm ²	BD Biosciences
Spritzen 2/5/10/20 ml	Braun
Einwegskalpelle	Socorex
Kanülen (gelb)	Braun
Kanülen (grün)	Braun
OP-Abdecktücher	Walter CMP
Nahtmaterial Prolene 6-0 und 7-0/0,7 metric	Ethicon
Nahtmaterial Mopylen, 6-0/0,7 metric	Resorba

wieder verwendbar, autoklavier-/desinfizierbar

Bezeichnung	Hersteller
Anatomische Pinzetten	Klinikum UK S-H
Chirurgische Pinzetten	Klinikum UK S-H
Präparierscheren	Klinikum UK S-H
Glasflasche Boro 100ml	Klinikum UK S-H
mikrochirurgische Federschere	Klinikum UK S-H
Nierenschale	Klinikum UK S-H

2.1.5 Der selbstexpandierende Nitinol-Stent

Die verwendeten Stents wurden von der Firma Nitinol Devices & Components Inc., Fremont, CA, USA hergestellt. Sie bestehen aus der Metalllegierung Nitinol, die sich aus Nickel (55%) und Titan (45%) zusammensetzt (Abb. 5).

Nitinol ist eine korrosionsbeständige und biokompatible Legierung mit der besonderen Eigenschaft der Superelastizität und des Formgedächtnisses (Shape Memory). Eine Dehnung der Legierung ist bis max. 10% möglich. Daraus resultiert eine hohe Knick- und Formstabilität. Bei Expansion bleibt der Stent längenstabil.

Ein Stent besteht aus drei Reihen mit jeweils 14 Rauten. Die Rautenspitzen der mittleren Reihe sind jeweils mit der Rautenspitze der oberen und unteren Reihe verbunden. Für diese Studie wurden Stents mit einem Durchmesser von 26 mm und einer Länge von 44 mm verwendet.



Abb. 5: Nitinol-Stent

2.1.6 Ovine Dünndarmmukosa

Um die Pulmonalklappen in dem Stent zu schützen und den klappentragenden Stent besser in einen Katheter einführen zu können, wurde der Stent mit Dünndarmmukosa ausgekleidet. Der in dieser Arbeit verwendete Dünndarm stammt von Schafen und wurde uns von dem Schlachthof Petersen in 24932 Lindaunis und der Schlachterrei Demir in 24601 Wankendorf zur Verfügung gestellt. Die Zeitspanne zwischen Entnahme und Weiterverarbeitung betrug 4-24 Stunden. Insgesamt wurden ca. 4 m Dünndarm verarbeitet.

2.1.6.1 Vorbereitung des ovinen Dünndarms

Um mit dem Dünndarm arbeiten zu können, musste er vorher aufbereitet werden. Hierfür wurde er mit lauwarmem Wasser von innen und außen gewaschen, bis kein verfärbtes Wasser mehr aus dem Darm zu spülen war. Zur weiteren Reinigung wurde der Dünndarm an einem Ende zugebunden und am anderen Ende mit Hilfe eines Trichters mit Betaisodonna befüllt. Dann wurde der Darm für eine Stunde im Kühlschrank (4°C) gelagert. Anschließend wurde das Betaisodonna mit sterilem PBS (ca. 1L/m Darm) ausgewaschen. Im Weiteren wurde der Darm auf einem Lineal in ca. 20 cm lange Stücke zurechtgeschnitten und je zwei Stücke in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben. Die Falconröhrchen wurden dann mit einer Lösung aus 500 ml PBS und 7 ml Penicillin/Streptomycin befüllt und bei -30°C eingefroren.

2.1.6.2 Präparation des ovinen Dünndarms

Für die weitere Präparation wurde jeweils ein Falconröhrchen mit je 2 Stücke des Dünndarms für einen Tag bei 4°C aufgetaut. An der Außenseite des Dünndarms wurden zuerst die Bindegewebsreste mit einer Präparierschere entfernt. Danach wurde der Dünndarm längs aufgeschnitten und auf einem sterilen OP-Tuch ausgebreitet. Anschließend wurde die Innenseite mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschabt (Abb. 6). Der nun von der Dünndarmmukosa befreite Darmabschnitt wurde um einen Stent gelegt (Abb. 7) und für 2-3 Stunden in einem Glasgefäß mit 100%igem Ethanol ausgehärtet.

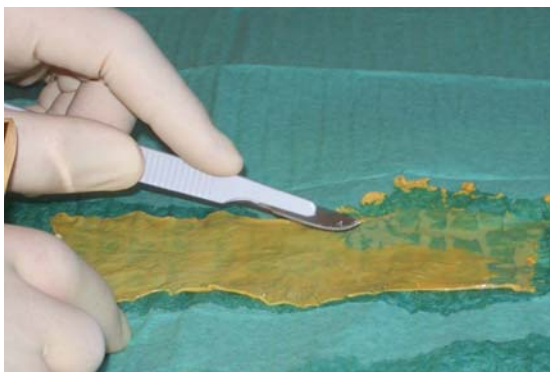


Abb. 6: Präparation der Dünndarmmukosa



Abb. 7: Aufrollen des Dünndarms

2.1.6.3 Einnähen des Dünndarms in den Stent

Der um den Stent gewickelte Dünndarm wurde nach der Lagerung in Ethanol abgerollt und dann in aufgerollter Form in den Stent gelegt. Anschließend wurde der Dünndarm mit Einzelknopfnähten (Doppelknoten) an den oberen, mittleren und unteren Kreuzungen der Rauten angenäht. Folgende Varianten wurden gewählt:

- Abtrennen des überschüssigen Darms an beiden Enden mit einer mikrochirurgischen Federschere (Abb. 8)
- Umschlagen des Darms am Rand und mit fortlaufender Naht entlang der Endzacken fixieren (Abb. 9)

Für die Naht wurde Polypropylen 7-0/0,7 metrisch verwendet. Da der sehr dünne Darmabschnitt an der Luft schnell porös wurde, musste er, um ihn vor dem Austrocknen zu bewahren, während der Verarbeitung regelmäßig befeuchtet werden. Hierfür wurde er entweder in ein Glas mit Ethanol, das den Darm eher in Form hält oder in ein Glas mit PBS getaucht, das den Darm eher formbar macht. Der Stent mit dem fixierten Dünndarm wurde dann im sterilen Urinbecher mit steriler 0,9% NaCl Lösung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Zeitspanne zwischen Lagerung und Weiterverarbeitung lag zwischen 0 und 1 Tag.



Abb. 8: Stent mit abgeschnittenem Dünndarmrand

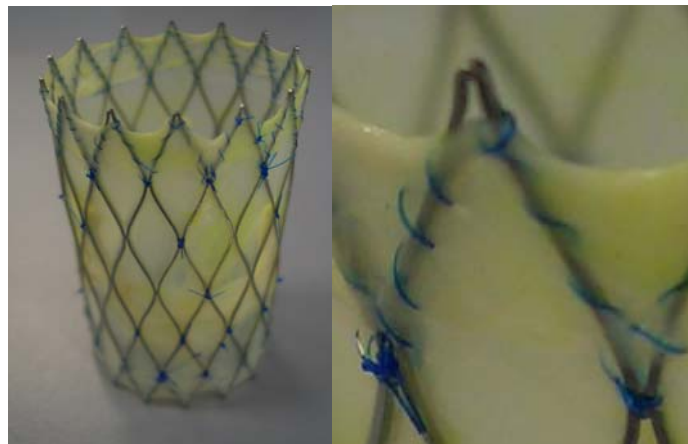


Abb. 9: Stent mit Dünndarm über den Endzacken und fortlaufender Naht

2.1.7 Die porcine Pulmonalklappe

Bei den verwendeten Schweineherzklappen handelte es sich um Pulmonalklappen, die aus ganzen Schweineherzen herauspräpariert wurden. Die Schweineherzen wurden von dem Schlachthof Lübeck und der Schlachtereier Lindaunis zur Verfügung gestellt und direkt nach der Schlachtung in die Klinik transportiert. Die Herzen wurden anschließend gesäubert, in Plastikbeuteln verpackt und bei -30 °C eingefroren. Insgesamt wurden 90 Schweineherzen verarbeitet.

2.1.7.1 Präparation der Pulmonalklappe

Für die Präparation der Pulmonalklappe wurde ein Schweineherz am Vortag bei 4°C aufgetaut. Zunächst wurde die Pulmonalarterie aufgesucht und präpariert, indem die bindegewebige Verbindung zwischen Aorta und Pulmonalis mittels einer Präparationschere getrennt wurden. Die Pulmonalis wurde so freigelegt, dass ein Teil der rechten Kammer zu sehen war. Dann wurde 2 cm unterhalb der Pulmonalklappe die Muskelschicht der Kammer und 4 cm über der Klappe die Gefäßwand mit einer Schere durchtrennt (Abb. 10 und 11). Danach wurde das Fett- und Bindegewebe vorsichtig mit einer Schere bzw. einem Skalpell entfernt. Anschließend wurden die Pulmonalklappen für mind. 30 min in Betaisodonna-Lsg. eingelegt und nachfolgend mit steriler 0,9%iger NaCl-Lsg. 2-3-mal gespült (bis Betaisodonna weitgehend ausgewaschen war).

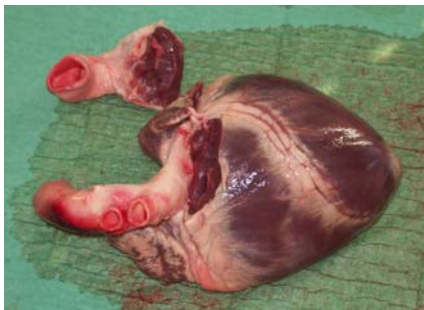


Abb. 10 : Schweineherz



Abb. 11 : Pulmonalissegment



Abb. 12 : Pulmonalklappe

Im nächsten Schritt wurde die Gefäßwand mit drei U-förmigen Einschnitten bearbeitet (Abb. 12). Hierbei war darauf zu achten, dass die drei so entstandenen Gefäß-Stege im Bereich der Klappenkommissuren (Ansatzpunkte der Segel) lagen. Die Gefäßwand dieser Stege wurde mit einem Skalpell in ihrer Dicke noch einmal halbiert. Zusätzlich wurden die Stege in ihrer Länge auf 1,5 cm gekürzt. Anschließend wurde die Muskelschicht mit einer Schere und einem Skalpell präpariert und hauchdünn geschnitten. Hierfür war es sinnvoll, den Zeigefinger von unten durch die Klappen zu schieben und mit Mittelfinger und Daumen das Präparat zu fixieren. Die Klappensegel, die sich so nach oben schoben, konnten auf diesem Wege nicht so leicht bei der Präparation beschädigt werden. Für die weitere Feinpräparation wurde mittels Pinzette, Skalpell und mikrochirurgischer Federschere überschüssiges Gewebe zirkulär Schicht für Schicht auf einige Millimeter gekürzt. Besondere Aufmerksamkeit erforderte die Präparation über den Klappensegeln im Bereich des Übergangs von Gefäßwand zur Muskelschicht. Sehr schwierig gestaltete sich auch die Feinpräparation der einzelnen Klappensegel. Da diese mit ihrer Innenseite fest mit der Muskelschicht verwachsen sind, musste hier besonders vorsichtig das Muskelgewebe entfernt werden. Um ein Austrocknen der Klappen zu verhindern, wurden sie in regelmäßigen Abständen in sterile 0,9%ige NaCl-Lsg. getaucht.

2.1.7.2 Einnähen der Pulmonalklappe in den Stent

Die Pulmonalklappe wurde direkt im Anschluss an die Präparation in den mit ovinem Dünndarm ausgekleideten Nitinolstent eingenäht. Hierbei wurden zuerst die drei Gefäßstege gleichmäßig von innen an den Darm angelegt und das obere Ende der Gefäßwand an der unteren Spitze der oberen Raute (bzw. oberen Spitze der mittleren Raute) mit einer Einzelknopfnah (Dreifachknoten) fixiert. Hierfür wurde Prolene 6-0 verwendet. Danach wurden die überstehenden Gefäßwandreste mit einer mikrochirurgischen Federschere entfernt. Anschließend wurden die Außenseiten der Klappentaschen in den Bereichen, in denen sie einer Rautenverbindung anlagen, mit einer Einzelknopfnah (Doppelknoten) fixiert. Hier war besonders darauf zu achten, nicht die Innenseite der einzelnen Taschen anzunähen und die Klappe nicht unter zu starker Spannung einzunähen. Für die sehr feinen Klappen wurde Prolene 7-0 verwendet. Während der Fixierung wurde der Stent regelmäßig in sterile physiologische 0,9 %ige NaCl Lösung getaucht (Abb. 13).

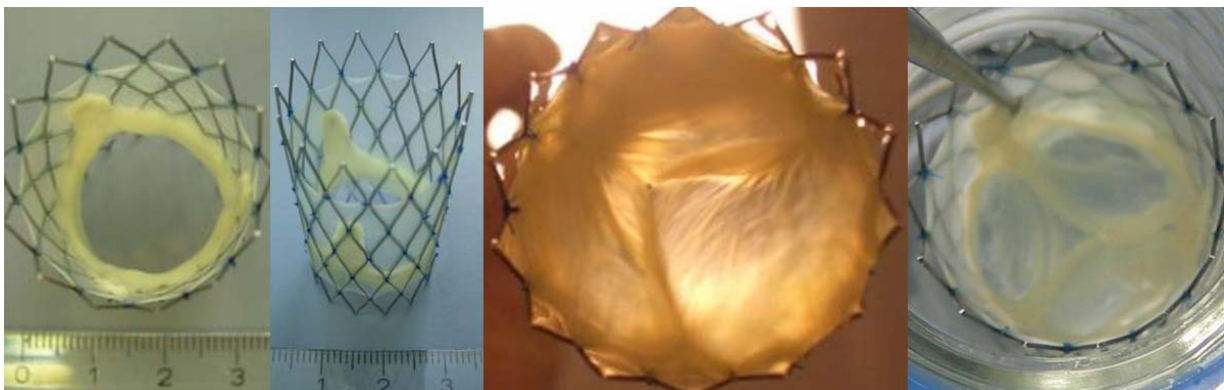


Abb. 13 : Fixierte Pulmonalklappe im Stent

2.1.8 Inkubation des klappentragenden Stents in Antibiotikallösung

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde der gefertigte klappentragende Stent in 100 ml Antibiotikallösung für 24 h bei 4°C im Kühlschrank inkubiert, um einer möglichen bakteriellen oder mykotischen Kontamination entgegen zu wirken. Unten genannte Medikamente wurden für die Lösung benötigt. Das Lösen und Mischen wurde unter sterilen Bedingungen unter der Bench durchgeführt:

Medikamente:

- 1 Ampulle Gentamicin Ratiopharm 40 SF
- 1 Flasche Pipril 1 g
- 1 Flasche Staphylex Injektion
- 1 Flasche Metronidazol 500 mg
- 1 Flasche Amphotericin B

- 1 Flasche Aqua ad iniectabilia, 50 ml (Reagentienbestellung)
- Human-Albumin 100 ml 20%
- 1 Flasche Medium 199, 500 ml

Durchführung:

- Pulversubstanzen lösen
 - 1 Flasche Pipril in 10 ml A. dest
 - 1 Flasche Staphylex in 20 ml A. dest
 - 1 Flasche Amphotericin in 10 ml A. dest
- In einem 200ml Becherglas
 - 0,4 ml Gentamicin,
 - 2,0 ml Pipril,
 - 4,0 ml Staphylex,
 - 8,0 ml Metronidazol,
 - 4,0 ml Amphotericin pipettieren.
- Mit M199 bis zur 100 ml Marke auffüllen und 100 ml Human Albumin hinzufügen

100 ml der fertigen Antibiotikalösung wurden in einen sterilen Urinbecher mit dem klappentragenden Stent gegeben und für 24 h bei 4°C inkubiert. Die restlichen 100 ml wurden für eine zweite Antibiotika Inkubation nach der Dezellularisierung vorerst in einem sterilen Urinbecher bei -20°C eingefroren.

AB-Konzentration pro 100 ml: 8 mg Gentamicin, 100 mg Piperacillin, 100 mg Flucoxacillin, 20 mg Metronidazol, 10 mg Amphotericin.

2.1.9 Der Dezellularisierungsprozess

Im Anschluss an die Inkubation in der Antibiotikalösung wurde der klappentragende Stent mit Trypsin/EDTA dezellularisiert. Die sowohl für die Zellkultur als auch für die Dezellularisierung verwendete Trypsin/EDTA-Lösung lag als Konzentrat vor. Die sterilfiltrierte Enzymlösung (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS) wurde bei -20°C gelagert und direkt nach dem Auftauen bei 37°C zur Dezellularisierung eingesetzt, um eine Selbstverdauung des Trypsins zu vermeiden. Die folgenden Arbeitsschritte wurden steril unter der Bench durchgeführt. Der klappentragende Stent wurde mittels einer Pinzette aus der Antibiotikalösung in einen Becher mit sterilen PBS gebracht und darin für mehrere Minuten gespült. Anschließend wurde der Stent in ein steriles Becherglas mit 100 ml T/E überführt, so dass er vollständig mit der Lösung bedeckt war. In dem verschlossenen Becherglas wurde der Stent in einen Rüttler gespannt und unter ständiger Rotation von 175 U/min bei 37°C/5% CO₂

für 24 h dezellularisiert. Direkt danach wurde der dezellularisierte Stent mehrmals in sterilem PBS gespült und für 24 h erneut in 100 ml steriler Antibiotikallösung (Zusammensetzung wie unter 2.1.8 beschrieben) unter ständigem Schütteln bzw. Rotieren bei 37°C / 5%CO₂ inkubiert. In dieser Phase sollten die durch das Trypsin angebauten Zellverbindungen gelockert und die losgelösten Zellen aus dem Gewebe herausgeschüttelt werden. Anschließend wurde der Stent einmal mit Hanks-Lösung gespült und in 100 ml Hanks-Lösung bei 4°C gelagert. In dieser Form konnte der klappentragende Stent bis zu 5 Tage gelagert werden.

Um verschiedene Inkubationszeiten mit Trypsin/EDTA zu testen, wurden in Vorversuchen drei klappentragende Stents gefertigt. Diese wurden für 24, 36 und 48 h dezellularisiert und anschließend untersucht. Dabei wurden die Stents makroskopisch begutachtet und mittels eines Suffizienztestes (s. 2.2.3) auf ihre Funktion untersucht. Ein Klappensegel des für 24 h dezellularisierten Klappenstents wurde zusätzlich histologisch untersucht (s. 2.1.13).

2.1.10 Zellgewinnung und Zellkultur der Primärzellen

Für die Besiedlung der dezellularisierten Klappen wurden primäre Endothel- und glatte Muskelzellen, die aus der Arteria carotis von Schafen stammten, verwendet. Erste erfolgreiche Kultivierungsversuche wurden mit Primärzellen, die von Stock et al. aus drei Schafen isoliert und kryokonserviert worden waren, durchgeführt. Anschließend wurden primäre Endothel- und glatte Muskelzellen von zwei Schafen aus dem eigenen Versuchstierbestand isoliert und in Kultur genommen. Alle Arbeitsschritte der Zellanzucht und -kultur wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Brutschrankbedingungen waren konstant bei 37°C, 5% CO₂-Begasung und 95% Luftfeuchtigkeit. Als Basismedium für die Kultivierung der Primärzellen wurde DMEM verwendet. Dem Medium wurde fötales Kälberserum (FKS), Wachstumsfaktor (bFGF) sowie eine Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt.

2.1.10.1 Arteria carotis Entnahme

Vorbereitung der Tiere für die Operation:

Unter Allgemeinanästhesie wurde die rechte ventrale Halsregion im mittleren Drittel des Halses geschoren und das Schaf auf dem Operationstisch in linke Seitenlage gebracht. Der Kopf wurde hierbei leicht nach dorsal und links überstreckt, um die rechte ventrale Halsregion besser zu exponieren. Das Operationsgebiet wurde gesäubert und desinfiziert und der restliche Tierkörper mit sterilen Tüchern abgedeckt. Den Tieren wurde über die Maulhöhle eine Magensonde gelegt und entsprechend des Erhaltungsbedarfs (ca. 10-20 ml/Kg/h) Ringer-Lösung intravenös infundiert. Das Narkosemonitoring beinhaltete EKG, Spirometrie und arterielle Blutdruckmessung.

Arterien-Entnahme:

Nach Inzision der Haut, etwa auf halber Höhe des Halses, wurde die rechte Arteria Carotis Interna auf einer Strecke von ca. 6-8 cm freigelegt. Unter Schonung der umliegenden Strukturen wurde die Arterie freipräpariert und mit einer proximalen und distalen Ligatur versehen. Der zwischen den Ligaturen befindliche Teil wurde anschließend entnommen, in zwei gleich große Stücke geteilt (jeweils ein Stück für ECs und SMCs) und in ein Falcon-Röhrchen mit sterilem DMEM gegeben. Nach Einlegen einer Drainage wurde die Wunde wieder verschlossen. Zum Transport vom OP ins Zelllabor und zur Aufbewahrung bis zur Zellgewinnung wurden die Arterien in sterilem DMEM (4°C) eingelegt.

2.1.10.2 Gewinnung und Anzucht von glatten Muskelzellen (SMC)

Vor der Weiterverarbeitung wurde das Bindegewebe der Arterie so gut wie möglich entfernt. Zusätzlich wurde die Arterie mittels einer 20 ml Spritze mit 15 ml DMEM durchgespült, wodurch Erythrozyten und Plaques gelöst und entfernt wurden. Das Gefäß wurde dann längs aufgeschnitten und die Innenseite auf einer sterilen Unterlage mehrmals abgewischt, um die Endothelzellen zu entfernen. Das aufgeschnittene Gefäß wurde danach mit einem Skalpell in einer Petrischale mit DMEM in 1 x 1 cm große Stücke zerlegt. In einer zweiten Petrischale wurden diese weiter in möglichst kleine Stücke (1-3 mm) geteilt (Abb. 14). Die Carotis-Stückchen wurden anschließend für 20-30 min an der Luft getrocknet bis sie eine bräunliche Farbe angenommen hatten. Nach dem Austrocknen wurden in die Petrischale tropfenweise 5-6 ml DMEM dazugegeben, so dass alle Stücke mit dem Medium bedeckt waren. Daraufhin wurden die Gefäßstücke in der Petrischale für sieben Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 4-5 Tagen konnte man mit einem Mikroskop erste aus den Stücken wachsende Zellen beobachten. Zu diesem Zeitpunkt wurde vorsichtig ein erster Mediumwechsel mit DMEM (altes Medium abpipettieren und 5-6 ml neues Medium zugeben) durchgeführt. Sobald die Petrischale mit glatten Muskelzellen zugewachsen war, konnte man diese auf eine T25 Flasche passagieren.

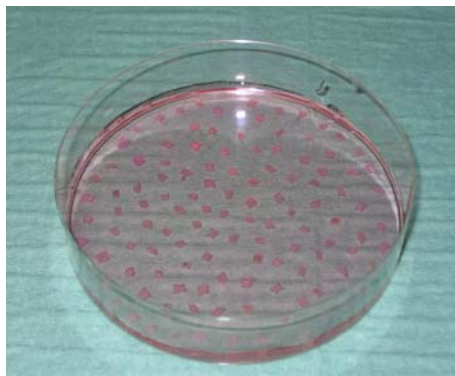


Abb. 14: Gefäßstückchen

2.1.10.3 Gewinnung und Anzucht von Endothelzellen (EC)

Vor Beginn der Endothelzellgewinnung wurde 0,02 g Collagenase A in 10 ml PBS (0,2%) gelöst und eine 24-Lochplatte mit 200 µl Gelatinelösung vorbeschichtet und in den Brutschrank gestellt. Die vorbereitete Collagenase A Lösung wurde dann steril filtriert. Die Arterie wurde an einer Seite mit einer sterilen Knopfkanüle, welche mit Nahtmaterial fixiert wurde, kanüliert. Über diese wurde die Arterie mittels einer 20 ml Spritze mit DMEM dreimal durchgespült, um Blutreste zu entfernen. Im Anschluss wurde das offene Ende der Arterie mit einer Bulldogklemme verschlossen und das Lumen mittels einer zweiten Spritze mit der Kollagenase-Lösung befüllt (Spritze in Kanüle stecken lassen). In diesem Zustand wurde die Arterie dann in einer Petrischale für 20 min im Brutschrank inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Durchspülung von 30 ml DMEM (Stoppmedium) beendet, wobei die dabei gewonnene Fraktion in 50 ml Falcon Röhrchen aufgefangen und bei 1200 U/min für 4 min bei 37°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit 1 ml DMEM resuspendiert und in die mit Gelatine vorbeschichtete 24-Lochplatte ausgesäht. Abschließend wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Erste Endothelzellen waren mit einem Mikroskop direkt nach der Anzucht zu erkennen.

2.1.10.4 Beschichtung der Lochplatten und Zellkulturflaschen mit Gelatine

Für die Kultivierung der Primärzellen mussten die Lochplatten bzw. Kulturflaschen zunächst mit einer 1% Gelatine-Lösung beschichtet werden. Zur Herstellung der 1 % Gelatine-Lösung wurde Gelatine in Aqua dest. bei 60°C erwärmt, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Dann wurde die Lösung filtriert und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert. Für die Beschichtung der Zellkulturflaschen wurde die Gelatine-Lösung im Wasserbad bei 37°C erwärmt und je nach Größe der Kulturflaschen 1-8 ml der Gelatine-Lösung in die Flaschen pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Gelatine-Lösung entfernt und die Flaschen zweimal mit PBS gespült.

2.1.10.5 Mediumwechsel

Zur Vitalitätserhaltung der Primärzellen wurde alle 48 h ein Mediumwechsel durchgeführt, da bestimmte Bestandteile des Mediums von den Zellen metabolisiert wurden oder bei 37°C im Laufe der Zeit zerfielen. Das verbrauchte Medium wurde mit Hilfe einer Pipette abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend die Lochplatten oder Zellkulturflaschen mit frischem Medium aufgefüllt. Folgende Mediumvolumen wurden einschließlich der verschiedenen Zellsuspensionen verwendet:

24-Lochplatte	→ 500 µl /Loch
6-Lochplatte	→ 2 ml /Loch
25 cm ² Flasche	→ 8 ml
75 cm ² Flasche	→ 20 ml

2.1.10.6 Trypsinieren und Passagierung der Zellen

Nach der Bildung eines Monolayers (ca. 80-90 % Konfluenz) wurde das Kulturmedium abgezogen und die adhärent wachsenden Primärzellen mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen, welches die Wirkung des Trypsins beeinträchtigen würde. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA Lösung vom Boden abgelöst, wobei so viel Reagenz zugegeben wurde, dass die gesamte Bodenfläche gut benetzt war. Durchschnittlich wurde ein Loch der 6-Lochplatte mit 2 ml, eine 25 cm² Flasche mit 4 ml und eine 75 cm² Flasche mit 8 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Die Reaktion wurde nach 2 min mittels eines Mikroskops überprüft und mit dem jeweils doppelten Volumen Stoppmedium beendet, indem die Zellen mit dem Medium resuspendiert wurden. Danach wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Röhrchen (bei 24-Lochplatte 15 ml Falcons) überführt und bei 1200 U/min für 4 min bei 37°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit Medium resuspendiert, je nach Menge gesplittet und in neuen Kulturflaschen bei 37°C inkubiert. Die Vermehrung der Primärzellen erfolgte ungefähr in folgenden Schritten:

Vermehrung der Endothelzellen

1 24er Loch → 3 24er Loch → 2 6er Loch → 1 75 cm² Flaschen → 3 75 cm² Flaschen → 6 75 cm² Flaschen → 8 75 cm² Flaschen.

Vermehrung der glatten Muskelzellen

10 cm² Petrischale → 1 25 cm² Flasche → 2 25 cm² Flaschen → 4 25 cm² Flaschen → 2 75 cm² Flaschen → 4 75 cm² Flaschen → 8 75 cm² Flaschen

2.1.10.7 Bestimmung der Lebendzellzahl und Vitalitätsprüfung

Die Bestimmung der Zellzahl und die Überprüfung der Vitalität erfolgte mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer und Trypanblau-Färbung. Dabei wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau verdünnt (1:2) und sofort in die Kammer gefüllt. Trypanblau dringt durch die geschädigte Plasmamembran toter Zellen ein. Vitale Zellen erschienen weiß und tote Zellen blau. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurde die Gesamtzellzahl und die Anzahl vitaler Zellen bestimmt. Ein Zählquadrat hat eine Fläche von 1 mm² und damit (bei einer Zählkammer-Tiefe von 0,2 mm) ein Volumen von 0,2 mm³. Um die Zellzahl pro ml zu berechnen, musste der

gefundene Wert (Mittelwert mehrerer Zählquadrate) mit dem Faktor 5000 und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert werden. Die Formel $Zellzahl \times 5000 \times 2 \times Volumen \text{ (in ml)}$ ergab die Gesamtzellzahl der untersuchten Kultur. Zusätzlich wurde der Anteil der lebenden Zellen in Prozent bestimmt ($Zahl \text{ der lebenden Zellen} \times 100 / \text{gesamte Zellzahl}$).

2.1.11 *In-vitro* Besiedlung der klappentragenden Stents

Für erste Besiedlungsversuche wurden drei dezellularisierte klappentragende Stents angefertigt. Eine Klappe wurde mit SMCs, eine Klappe mit ECs und eine Klappe mit SMCs und ECs besiedelt. Die von Stock et al. isolierten und anschließend von uns in Kultur expandierten Primärzellen wurden hier verwendet. Um die Besiedlungsvorgänge zu untersuchen und histologisch darzustellen, wurden H&E-Färbungen der jeweiligen Klappensegel angefertigt (s. 2.1.13). Zwei *in vitro*-Besiedlungen wurden schließlich mit autologen Primärzellen geplanter Empfängertiere (für die Klappenstentimplantation) aus unserem Versuchstierbestand durchgeführt.

2.1.11.1 statische Besiedlung mit glatten Muskelzellen

Die statische Besiedlung mit glatten Muskelzellen wurde an sechs aufeinander folgenden Tagen durchgeführt.

1. Tag:

- SMCs von vier T75 Flaschen mit Trypsin lösen (pro T75 Flasche 5 ml Trypsin), so dass insgesamt eine Zellsuspension von 20 ml vorliegt
- Stent in 100 ml Glasflasche geben, die Zellsuspension mit einer Pipette gleichmäßig auf der Klappe verteilen und 30 min in Ruhe stehen lassen
- Glasflasche mit 60 ml Medium auffüllen, verschließen und bei 37°C auf dem Rüttler inkubieren

2. Tag:

- Stent aus der Glasflasche nehmen und auf eine Petrischale stellen
- SMCs aus weiteren 3-4 T75 Flaschen mit Trypsin lösen und die 20 ml Zellsuspension mit einer Pipette auf den Stent auftragen und 30 min in Ruhe stehen lassen
- Stent in die vom 1. Tag mit Medium gefüllte Glasflasche stellen, die abgetropfte Zellsuspension aus der Petrischale in die Flasche geben und bei 37°C auf dem Rüttler inkubieren

3. – 6. Tag:

- weiter bei 37°C inkubieren und Rüttler 1-2 Stunden pro Tag ausstellen

2.1.11.2 Dynamische Bioreaktorkultur

Mit dem Bioreaktor sollten *in vitro*-Bedingungen geschaffen werden, um das mit glatten Muskelzellen besiedelte Klappengerüst zu vitalem, dreidimensionalen Gewebe heranreifen zu lassen. In diesem System wurden *in vivo*-Bedingungen künstlich nachgeahmt.

Nach der statischen Besiedlung wurden die Klappen in einer speziellen Halterung fixiert und für 16 Tage in den Bioreaktor eingebaut (7.- 23. Tag)

7. Tag:

- klappentragenden Stent in den Bioreaktor einbauen und Bioreaktor mit 1,5 L Kulturmedium füllen (Zugabe 4 ml AB-Lösung; s. 2.1.9)

14. Tag:

- nach sieben Tagen Medium im Bioreaktor erneuern (Zugabe von 2 ml AB-Lösung)

23. Tag:

- klappentragenden Stent aus dem Bioreaktor ausbauen

2.1.11.3 Statische Endothelzellbesiedlung

Nach der SMC-Besiedlung und der dynamischen Kultivierung erfolgte die Besiedlung mit Endothelzellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen.

23.Tag:

- kultivierte Endothelzellen von vier T75 Flaschen mit Trypsin lösen, so dass 20 ml Zellsuspension vorliegen
- Stent in 100 ml Glasflasche geben, die Zellsuspension mit einer Pipette gleichmäßig auf der Klappe verteilen und 30 min in Ruhe stehen lassen
- Glasflasche mit 60 ml Medium auffüllen, verschließen und bei 37°C inkubieren
- 2 Stunden auf den Rüttler stellen

24.Tag:

- Stent aus der Glasflasche nehmen und auf eine Petrischale stellen
- ECs aus weiteren 3-4 T75 Falschen mit Trypsin lösen und die 20 ml Zellsuspension mit einer Pipette auf den Stent auftragen und 30 min in Ruhe stehen lassen
- Stent in die vom 1. Tag mit Medium gefüllte Glasflasche stellen, die abgetropfte Zellsuspension aus der Petrischale in die Flasche geben und bei 37°C inkubieren
- 2 Stunden auf den Rüttler stellen

25. .Tag:

- weiter in Ruhe bei 37°C inkubieren
- 2 Stunden auf den Rüttler stellen

2.1.11.4 Der Bioreaktor

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

Der Bioreaktor wurde von der Firma JEN.medic GmbH aus Jena entworfen und von Herrn Mück (Kardiotechniker am UKSH Campus Kiel) weiterentwickelt.

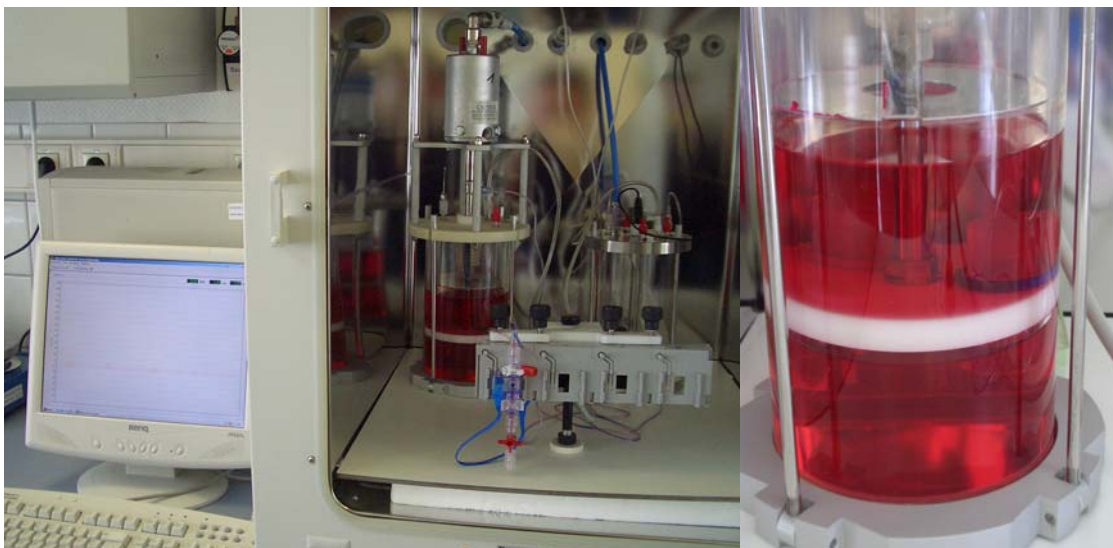


Abb. 15 : Bioreaktor

2.1.12 Histologie von dezellularisierten und besiedelten Klappensegeln

Um sowohl das Dezellularisierungsverfahren als auch die Besiedlung mit glatten Muskelzellen und Endothelzellen zu veranschaulichen, wurden vier klappentragende Stents histologisch aufgearbeitet. Zu diesem Zweck wurden Gefrierschnitte von einem Klappensegel eines dezellularisierten Stents und jeweils von einem Klappensegel eines mit glatten Muskelzellen, eines mit Endothelzellen und eines mit beiden Zellenarten besiedelten Stents angefertigt um anschließend eine Hämalaun-Eosin-Färbung durchzuführen.

Die H&E-Färbung ist eine Zellübersichtsfärbung, bei der Zellkerne blau und extrazelluläre Matrix rosa dargestellt werden. Auf diese Weise konnte in der vorliegenden Arbeit die Azellularität bzw. die Zelldichte exemplarisch demonstriert werden.

Die Fixierung der Gerfrierschnitte auf den Objektträgern erfolgte bei -20°C für 8 min in Aceton mit anschließender Lufttrocknung für 30 min bei Raumtemperatur. Zur Rehydrierung wurden die Präparate für 10 s in Aqua dest. inkubiert. Anschließend erfolgte eine Blaufärbung der Zellkerne durch eine 8-minütige Inkubation in einer Hämalaunlösung nach Mayer. Ein 10-minütiges Nachbläuen unter fließendem Leitungswasser schloss diesen Färbeschritt ab.

Im nächsten Schritt wurde durch Inkubation der Präparate in 0,1%iger Eosinlösung für 5 min sowohl das Zytoplasma als auch die extrazelluläre Matrix rosa angefärbt. Nach einer Inkubation für 10 s in Aqua dest. erfolgte eine mehrschrittige Entwässerung in 80%igem, 90%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol. Anschließend wurden die Objektträger für zweimal 5 min in Xylol inkubiert und mit Eindeckmittel (Corbit-Balsam) unter einem Deckgläschen versiegelt.

2.2 *In vitro*-Untersuchungen der klappentragenden Stents

In *in vitro*-Versuche wurden sowohl an den gefertigten Prototypen als auch an den für die Implantation vorgesehenen klappentragenden Stents durchgeführt. Die Prototypen wurden für den Kathetereinsatz und auf ihre Suffizienz mittels Kochsalzlösung getestet. Die für die Implantation gefertigten Stents wurden durch makroskopische Begutachtung, Beurteilung der Expansionsfähigkeit und einem Suffizienztest mittels Kochsalzlösung untersucht. Drei Stents wurden weiterhin mikrobiologisch untersucht und ein Stent wurde exemplarisch auf seine Funktion an einem Kreislaufmodell getestet.

2.2.1 Kathetertest

Um die Anwendbarkeit der Prototypen für das Applikationskathetersystem zu untersuchen, wurden die Stents zusammengefaltet, in einen 22 French Katheter eingeführt und dort für 1 min belassen. Anschließend wurden die Stents entfaltet und auf ihre Funktion und Suffizienz untersucht.

2.2.2 Expansionsfähigkeit

Um die Expansionsfähigkeit der gefertigten Stents zu beurteilen, wurden diese in ein Gefäß mit 3 bzw. 37°C gegeben. Die Stents wurden für 10 min in dem jeweiligen Gefäß belassen. Anschließend wurde der Innendurchmesser mit einer Schieblehre bestimmt.

2.2.3 Suffizienztest mit physiologischer Kochsalzlösung

Um einen ersten Eindruck über die Suffizienz der klappentragenden Stents zu bekommen wurden sie mittels physiologischer Kochsalzlösung auf ihre Durchlässigkeit geprüft. Hierbei wurde der Stent mit einer Pinzette in ein Becherglas mit physiologischer Kochsalzlösung

getaucht und anschließend über den Flüssigkeitsspiegel gehalten. Auf diese Weise wurde eine Flussrichtung gegen die Klappe erzeugt, so dass eine Flüssigkeitssäule, die von der Klappe getragen wurde, entstand. Um die Funktionalität der einzelnen Klappen beurteilen zu können, wurde die Zeit (in 5 Sekunden-Schritten) bis zum vollständigen Verschwinden der Wassersäule gemessen.

2.2.4 Funktionstest am Kreislaufmodell

Ein dezellularisierter klappentragender Stent wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. M. Steiner exemplarisch auf seine Funktionalität und Strömungseigenschaft an einem pulsativen Strömungsmodell getestet. Dieses Kreislaufmodell, welches von Herrn Dr. rer. nat. Steiner in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor G. Pfister am Institut für experimentelle und angewandte Physik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel entworfen wurde, konnte die exakten Druck- und Strömungsverhältnisse des rechten Ventrikels reproduzieren. Die Verhältnisse, denen die Stents als Pulmonalklappenersatz dauerhaft ausgesetzt sind, konnten so simuliert werden. In drei Messungen wurde mittels Drucksensoren oberhalb und unterhalb der Klappenebene der transvalvuläre Gradient ermittelt.

Die gewonnenen Druckwerte jeder einzelnen Messung wurden über zwölf Zyklen mit einer Software gemittelt. Die Messungen für den transvalvulären Gradienten wurden bei einer Frequenz von 60 Schlägen pro Minute und einem Ejektionsvolumen von 73 ml durchgeführt. Zur Füllung der pulsativen Strömungsanlage wurde Aqua dest. verwendet, welches in der Anlage auf 37°C erwärmt wurde.

2.2.5 Mikrobiologische Abstriche

Drei klappentragende Stents wurden mittels eines Abstriches mikrobiologisch untersucht, um eine mögliche Kontamination mit Bakterien oder Pilzen nachzuweisen. Auf diese Weise sollte die Wirksamkeit der Antibiotika-Inkubation untersucht werden. Der Abstrich wurde direkt von dem Pulmonalklappensegel genommen und in das Institut für Mikrobiologie und Virologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Kiel) geschickt. Dort wurde nach gängigen Methoden eine Erregeranzucht, -differenzierung und Resistenzbestimmung sowie eine Pilzanzucht und -differenzierung durchgeführt

2.3 Der Einsatz am ovinen Modell

Zur *in vivo*-Evaluation der hergestellten Stents wurden in dieser Studie 11 dezellularisierte Stents und 1 *in vitro* besiedelter Stent am ovinen Großtiermodell implantiert.

Während in der vorliegenden Arbeit nur Todeszeitpunkt und -ursache der Versuchstiere und mögliche Kausalzusammenhänge mit der Stentkonstruktion diskutiert werden sollen, findet

sich in den Dissertationsschriften von Herrn cand. med. Florian Ambrust und Frau cand. med. Alkje Twellmeier eine detaillierte Evaluation der *in vivo*-Versuche. Nach erfolgreicher Implantation wurden dort im besonderen die hämodynamischen Parameter, die Suffizienz und das Migrationsverhalten der klappentragenden Stents untersucht.

2.3.1 Applikationsverfahren

Ein geeignetes Kathetersystem wurde von Frau K. Rumberg (siehe Dissertationsschrift Frau cand. med. K. Rumberg) evaluiert und bereits erfolgreich für die Implantation von bovinen Jugularvenenstents etabliert.

Zur Platzierung des klappentragenden Stents in der Pulmonalposition wurde das kommerziell zu erwerbendes Kathetersystem Talent 22F der Firma Medtronic, Santa Rosa, CA, USA benutzt, welches normalerweise auf dem Gebiet der aortalen Endoprothesen eingesetzt wird. Dieses Kathetersystem wurde für den Einsatz in unserem Labor modifiziert. Der Katheter hat eine Gesamtlänge von 156,5 cm und eine nutzbare Länge von 90 cm. Der äußere Durchmesser beträgt 22 French, der innere Durchmesser der äußeren Hülle 19,5 French.

Der Raum, in dem der klappentragende Stent platziert wird, ist proximal durch einen Pusher begrenzt. Dies ist eine flexible Metallspirale, der ein Plastikkopf aufsitzt. Distal wird der Raum durch eine 6,5 cm lange, konisch geformte Olive begrenzt, welche aus weichem Silikon besteht. Am unteren Ende des Katheters befinden sich zwei Griffe. Der eine ist mit der äußeren aus durchsichtigem Plastik bestehenden Führungshülse verbunden, der andere mit dem sich in der Führungshülse befindlichen Pusher. Proximal an diesem Griff befindet sich noch ein Zulauf, über den eine Spülung des Systems ermöglicht wird (Abb. 16).

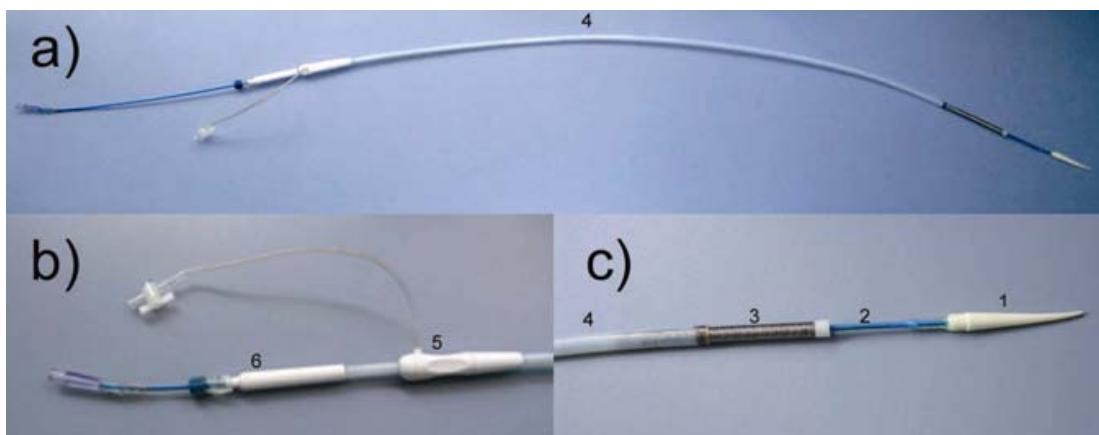


Abb. 16: Medtronic-Talent 22F

a) Gesamter Katheter, b) proximaler Anteil mit Pusher und Griff, c) distaler Anteil.

1 Olive, 2 Raum für Klappenstent, 3 innere Führungshülse mit Spiralfeder, 4 äußere Führungshülse, 5 Griff mit Spülvorrichtung, 6 Pusher.

2.3.2 Versuchsdurchführung

2.3.2.1 Anästhesie

Die Prämedikation der Schafe erfolgte durch intramuskuläre Injektion von 0,15-0,2 mg/kg Körpergewicht (KG) Midazolam, 5-10 mg/kg KG Ketamin sowie 0,25 mg Atropin.

Es erfolgte die Anlage eines venösen Zugangs in eine Ohrvene, über welchen 2 mg/kg KG Propofol appliziert wurde. Unter laryngoskopischer Kontrolle wurde ein Endotrachealtubus, individuell angepasst zwischen 6,0 und 7,5 mm I.D., mit Niederdruckcuff eingeführt. Zusätzlich wurden die Schafe mit einer Magensonde versorgt. Beide Leisten und die zur Ableitung des EKGs benötigten Körperregionen wurden rasiert und das Tier auf dem Angiographie-Tisch in Rückenlage fixiert.

Die Aufrechterhaltung der Narkose wurde mittels kontinuierlicher Propofol-Infusion mit initial 12-14 mg/kg KG/h durchgeführt, wobei gegebenenfalls eine individuelle Anpassung der Narkose vorgenommen wurde. Weiterhin bekamen die Schafe alle 20-30 min Ketaminboli von 50 mg. Im Bereich der inguinalen Punktionsstellen erfolgte zur Lokalanästhesie die Injektion von 2%igem Mepivacain. Die maschinelle Beatmung erfolgte mit einem Atemzugvolumen von 10-15 ml/kg KG und 12-15 Atemzügen pro Minute und wurde mit intermittierender Kontrolle der arteriellen Blutgasanalyse individuell angepasst.

Zur basalen Volumensubstitution wurden 20-30 ml/kg KG Ringerlösung *per infusionem* gegeben. Weiterhin wurde jedes Tier präoperativ mit 1,5 g Cefuroxim antibiotisch behandelt.

2.3.2.2 Implantationsvorbereitung

Nach steriler Abdeckung des Schafes und Desinfektion beider Leisten mit Kodan (Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt) wurde unter Dopplerkontrolle eine 5 F-Schleuse zwecks Blutdruckbestimmung und intermittierenden Blutgasanalysen in die linke A. femoralis gelegt. Beide Femoralvenen wurden mit 9 F-Schleusen (Terumo®, Radiofocus®, Tokyo, Japan) versorgt, um einen Angiographiekatheter (Cordis®, Johnson&Johnson, Langenfeld, Germany) und einen Messkatheter (Cook®, Aurous®, Bjaeverskov, Denmark) einführen zu können.

Mit Hilfe des Messkatheters wurde die Angiographieanlage (Multistar Top, Siemens, Erlangen, Deutschland) kalibriert. Dann wurde der Durchmesser des Pulmonalklappenannulus in mm bestimmt. Nach der Auswertung der unter Kontrastmittelgabe erhaltenen Bilder wurde eine optimale Einstellung des C-Bogens herbeigeführt und ebenso die Pulmonalklappenebene in der endgültigen Einstellung auf dem Bildschirm mit einem Wachsstift markiert. Über die rechte Vena femoralis wurde ein Führungsdraht in die linke A. pulmonalis vorgeschoben. Nach der Gabe von 200 IU/kg KG Heparin wurde die rechte 9 F-Schleuse durch eine 24 F-

Schleuse ersetzt. Währenddessen wurde das Applikationskathetersystem Talent 22 F für die Implantation vorbereitet. Der Klappenstent wurde manuell zusammengefaltet und in den Katheter eingesetzt. Der Katheter selbst wurde zuvor mit Silikonspray präpariert um die optimale Gleitfähigkeit der verschiedenen Hülsen zueinander und damit die komplikationslose Handhabung zu gewährleisten.

2.3.2.3 Stent-Implantation

Das mit dem ausgewählten Klappenstent geladene Applikationskathetersystem (Abb. 17) wurde über den Führungsdraht durch die 24-F Schleuse in die rechte Vena femoralis eingeführt und unter Röntgenkontrolle bis in die A. pulmonalis vorgefahren (Abb. 18).

Nachdem die exakte Positionierung auf Pulmonalklappenebene gegebenenfalls durch Kontrastmittelgabe erneut überprüft wurde (Abb. 19), begann die eigentliche Implantation durch den Auswurf des Klappenstents (Abb. 20). Nach der vollständigen Entfaltung des Stents mit Anlage seiner äußeren Fläche an die Gefäßwand wurde der Katheter vorsichtig zurückgezogen. Abbildung 21 veranschaulicht die Positionierung des klappentragenden Stents.



Abb. 17: Mit Stent beladener Katheter



Abb. 18: Hochfahren des Katheters

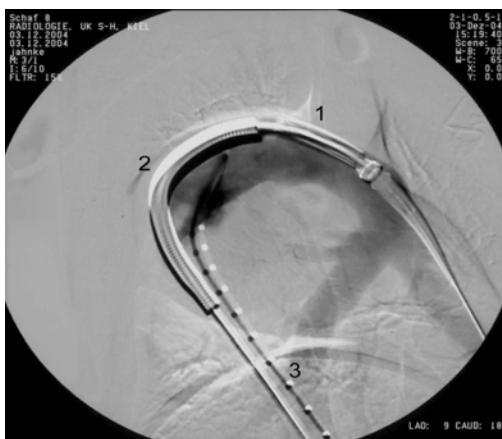


Abb. 19: Applikationssystem in Implantationsposition
1 zusammengefalteter Stent, darüber
2 äußere Führungshülse.

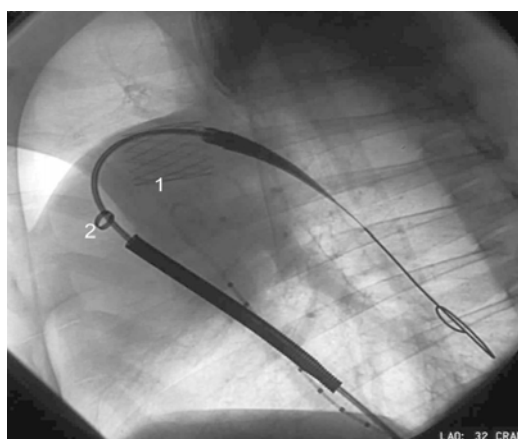


Abb. 20: Stent auf Pulmonalklappenhöhe
1 entfalteter Klappenstent,
2 Ende der zurückgezogenen äußeren
Führungshülse.

Anschließend folgte eine weitere Kontrastmittelgabe zur abschließenden Kontrolle der Klappenstentlage und zur Funktionsprüfung der neuen Klappe.

Die Heparinisierung wurde durch die Gabe von Protamin antagonisiert und nachdem die 24-F Schleuse entfernt war, wurde die Leiste für 30 min manuell komprimiert, bevor abschließend die Punktionsstelle durch eine einzige Einzelknopfnahm verschlossen wurde.

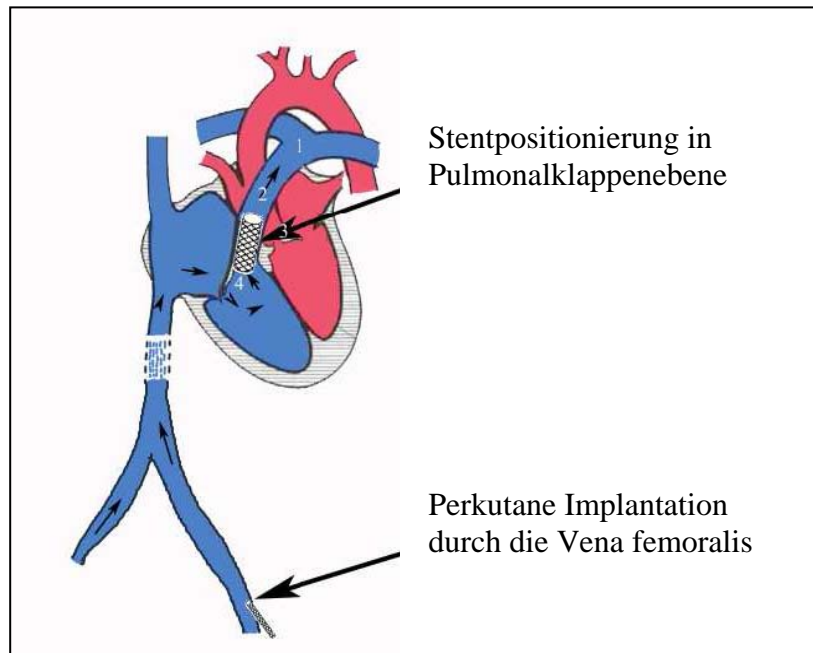


Abb. 21: Schaubild zur Stentpositionierung

2.3.3 Untersuchung der letalen Komplikationen

Bei den Versuchstieren die während und nach der Implantation verstarben, wurde eine Autopsie durchgeführt. Dabei wurden vor allem das Herz und das Pulmonalissegment auf Verletzungszeichen untersucht, um mögliche Akutauswirkungen und damit verbundene Risiken der Stent-Applikation zu demonstrieren.

3 Ergebnisse

3.1 Die Herstellung der klappentragenden Stents

3.1.1 Präparationsversuche

Für erste Präparationsversuche wurden 50 Schweineherzen verbraucht. Die Präparation und die Fixierung der Pulmonalklappe gestaltete sich anfangs schwierig. Folgende Anforderungen standen dabei im Vordergrund:

- die Klappe so präparieren, dass sie nicht beschädigt wird (Verbrauch von 10 Klappen)
- die Klappe so einnähen, dass Stabilität und Funktion gewährleistet sind (Verbrauch von 10 Klappen)
- die Klappe so präparieren, dass sie in einen Katheter passt (Verbrauch von 30 Klappen)

Die ersten zehn ohne Beschädigungen präparierten Pulmonalklappen wurden verwendet, um die Art der Fixierung zu testen. Hier zeigte sich, dass Prolene 6 für die Gefäßstege und Prolene 7 für die Klappensegel geeignet ist. In einem Gefäß mit NaCl wurden diese Klappenstents dann auf ihre Funktion und Suffizienz getestet (Abb. 22). Die stabil fixierten und suffizienten Klappen waren jedoch noch zu groß, um sie für den Kathetereinsatz ausreichend komprimieren zu können. Weitere 30 Pulmonalklappen wurden verwendet, um durch eine immer feinere Präparation mittels Skalpell und einer mikrochirurgischen Federschere den Einsatz in einem 22 French Katheter zu erproben.

Im nächsten Schritt wurden zehn Prototypen (klappentragende Stents mit ausgekleidetem Dünndarm) gefertigt, an denen erste nachfolgend beschriebene Untersuchungen zur Beurteilung von Qualität, Funktion und Suffizienz durchgeführt wurden.

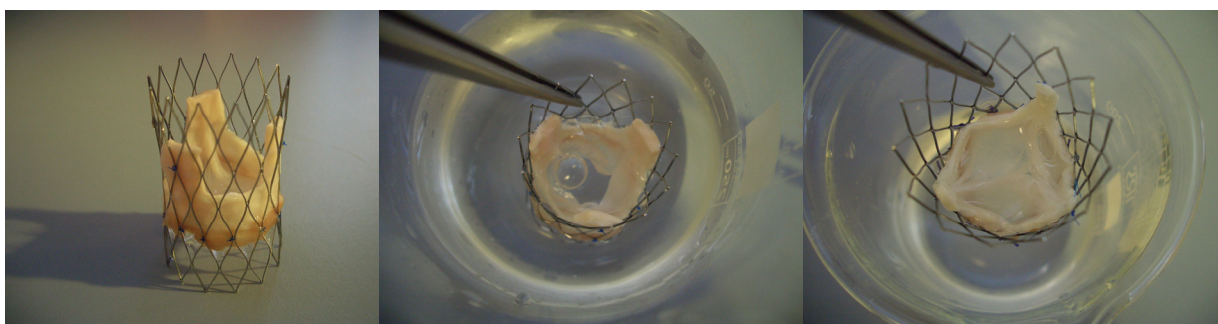


Abb. 22: Im Stent fixierte Klappe

3.1.2 Untersuchung der Prototypen

Die zehn Prototypen wurden grob durch makroskopische Begutachtung, den Suffizienztest mit NaCl und einen Kathetereinsatz untersucht (s. 2.2). Die präparierten Pulmonalklappen waren von ihrer Größe für 26 mm Stents gut geeignet. Die Anatomie und Funktion der Klappensegel wurde durch die Fixierung im Stent nicht beeinträchtigt.

Alle Prototypen zeigten im Suffizienztest mit NaCl gute Ergebnisse. Die Klappen öffneten und schlossen sich regelrecht und hielten die Wassersäule zwischen 60 und 135 s bei einem durchschnittlichen Wert von 110 s.

Alle zehn Prototypen passten in einen 22 French Katheter. Nach einer Minute wurden die klappentragenden Stents wieder entfaltet und zeigten in ihrer Funktion keine Einschränkungen. Auch nach dem Kathetereinsatz hielten alle klappentragenden Stents die Wassersäule zwischen 50 und 120 Sekunden, bei einem durchschnittlichen Wert von 101 s (Abb. 22 und 23).

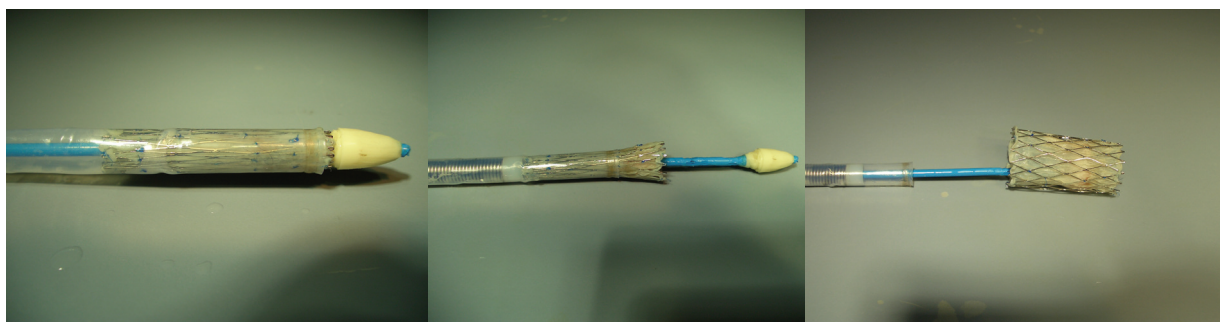


Abb. 23: Klappentragender Stent im Katheter und Entfaltung des Stents



Abb. 24: Stent nach Kathetereinsatz

3.1.3 Die Dezellularisierung mit Trypsin/EDTA

Mittels der Dezellularisierung wurden die ursprünglichen Gefäßzellen der Pulmonalklappen entfernt. Auf diese Weise sollten die azellulären Klappen den eigenen Zellen der Spendertiere als dreidimensionaler Strukturspender dienen. Um bei der späteren Implantation Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, war es notwendig, möglichst alle Gefäßzellen der Klappen zu entfernen. Zum anderen war es wichtig, dass bei dem Prozess der Dezellularisierung die netzwerkartige dreidimensionale Struktur der Matrix weitestgehend erhalten blieb.

Nach der erfolgreichen Präparation der Prototypen wurden drei klappentragende Stents für Dezellularisierungsversuche gefertigt.

3.1.3.1 Dezellularisierungsversuche mit verschiedenen Inkubationszeiten

Die Dezellularisierung mit Trypsin/EDTA wurde in Vorversuchen mit verschiedenen Inkubationszeiten von 24, 36 und 48 h getestet. Der Klappenstent, der 24 h dezellularisiert worden ist, zeigte sich makroskopisch ohne Beschädigungen und Funktionseinschränkungen. Im Suffizienztest mittels physiologischer Kochsalzlösung konnte er die Wassersäule 125 sec halten.

Die Klappen der beiden Klappenstents, die 36 h und 48 h dezellularisiert wurden, waren deutlich in ihrer Struktur beschädigt bzw. angedaut und konnten keinen suffizienten Klappenschluss gewährleisten. Die einzelnen Klappensegel erschienen ausgefranst und ausgeleiert. Im Suffizienztest mittels physiologischer Kochsalzlösung konnten sie die Wassersäule 40 bzw. 25 sec halten.

Die Inkubationszeit der Dezellularisierung wurde so auf 24 h festgelegt.

3.1.3.2 Histologische Untersuchung eines dezellularisierten Klappensegels

Um die Struktur der für 24 h dezellularisierten Klappe zu bewerten, wurde eine Hämalaun & Eosin-Färbung eines Klappensegels angefertigt. Es zeigten sich kaum verbliebene Zellen im Klappensegel. Die Quervernetzung der kollagenen Fasern der extrazellulären Matrix war leicht verändert, jedoch noch deutlich zu erkennen (Abb 25).

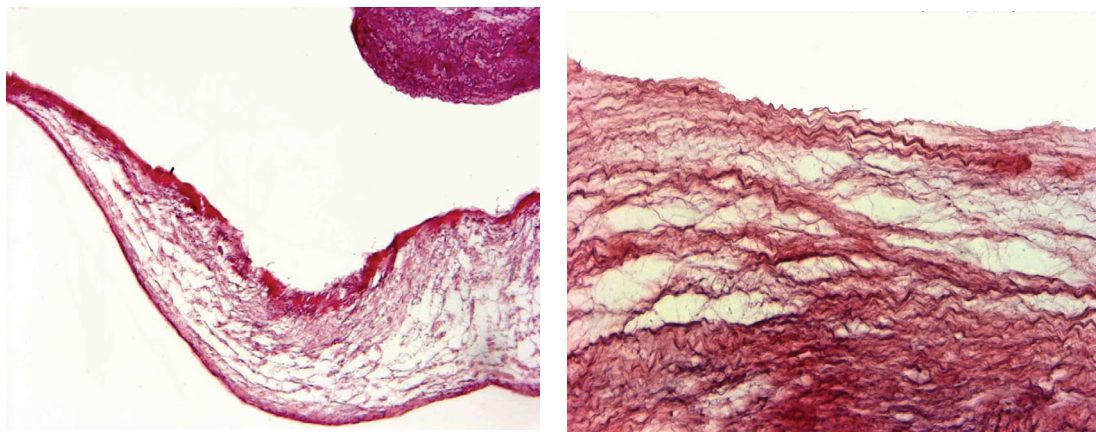


Abb. 25: H&E Färbung eines Klappensegels in 100x Vergrößerung

3.1.4 Zellgewinnung und Kultivierung der Primärzellen

Insgesamt wurden fünf EC-Kulturen und fünf SMC-Kulturen angelegt. Die für die Besiedlung benötigte Zellzahl wurde durch Versuche der Arbeitsgruppe von Dr. Stock auf jeweils acht T75 Kulturflaschen mit insgesamt jeweils 25-30 Millionen ECs und SMCs festgelegt, wobei eine T75 Flasche mind. 3 Millionen Zellen beinhalten sollte.

3.1.4.1 Glatte Muskelzellen (SMC)

Aus den adhärennten Gefäßwandstückchen auf den Petrischalen wuchsen nach fünf Tagen sternförmig die ersten SMC-Zellen aus. Das Zellwachstum wurde mittels Mikroskopkontrollen beobachtet. Nach ca. 12 Tagen war eine konfluente Zellschicht zu erkennen (Abb. 26). Die Zellen wurden daraufhin in eine T25 Kulturflasche passagiert. Nach weiteren 4-5 Passagen wurden die Zellen auf acht T75 Kulturflaschen vermehrt. Die Anzuchtdauer der glatten Muskelzellen lag in den fünf durchgeführten Kultivierungsversuchen mit 21 bis 23 Tagen (3 à 22 Tage, 1 à 21 Tage, 1 à 23 Tage) bei durchschnittlich 22 Tagen.

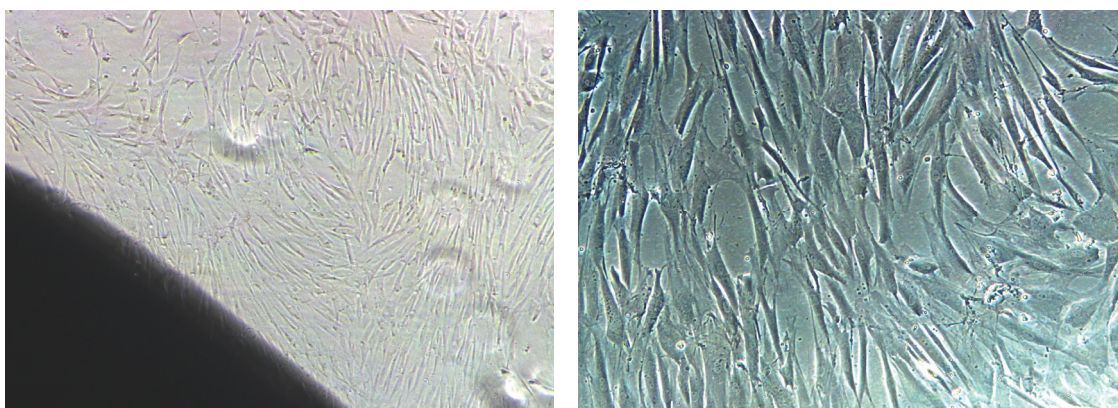


Abb. 26: SMC-Zellen in 50x und 100x Vergrößerung

3.1.4.2 Endothelzellen

Nach Isolierung der Endothelzellen zeigten diese in den ersten drei Tagen das für sie typische inselförmige Wachstum (Abb. 27). Die erste Passagierung (von einem 24-well auf drei 24-well) konnte bereits nach fünf Tagen durchgeführt werden. Auch hier wurden 4-5 weitere Passagierungen vorgenommen, bis die Anzahl von acht T75 Kulturflaschen erreicht wurde. Der gesamte Vermehrungsprozess der Endothelzellen dauerte in den fünf durchgeführten Kulturansätzen zwischen 19 und 20 Tagen (3 à 20 Tage und 2 à 19 Tage).

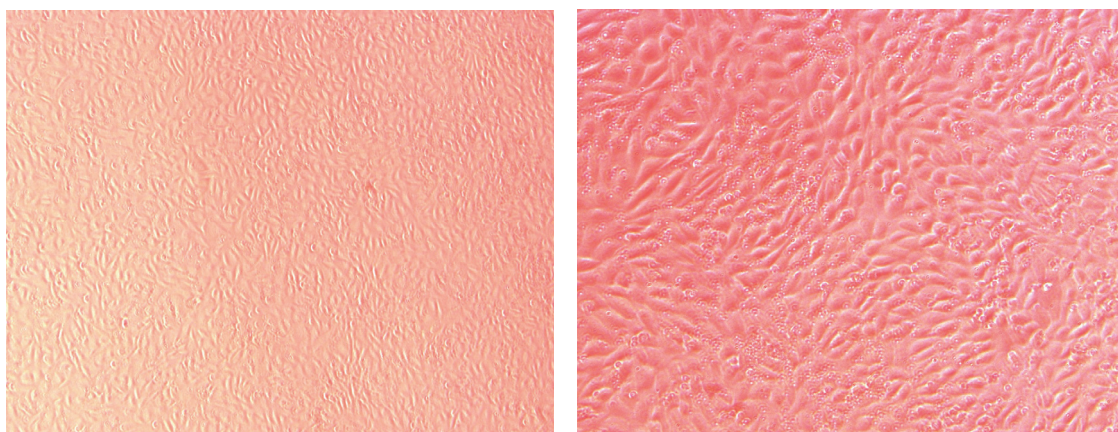


Abb. 27: Endothelzellen in 50x und 100x Vergrößerung

3.1.4.3 Vitalitätsprüfung und Zellzählung

Um die für die Besiedlung nötige Zellzahl zu kontrollieren und sicher zu gehen, dass die Zellkulturen intakt sind, wurde bei allen angelegten Kulturen mehrfach die Vitalität der Zellen untersucht und eine Zellzählung durchgeführt. Die Vitalität sowohl der Endothelzellen als auch der SMC-Zellen lag regelmäßig über 97 %. Die Zellzahl pro T75 Kulturflasche lag immer zwischen 3,5 und 5,8 Millionen Zellen.

3.1.5 Die *in vitro*-Besiedlung

In der H&E Färbung nach 6-tägiger statischer SMC-Besiedlung und 16-tägiger dynamischer Bioreaktorkultur konnten deutlich Zellnester dargestellt werden. Die Zellkerne (blau) waren gut sichtbar (Abb. 28). Die Fasern der extrazellulären Matrix zeigten auch nach der Perfusion im Bioreaktor eine gute Quervernetzung und waren nicht aufgequollen.

Die H&E Färbung nach 3-tägiger Endothelzellbesiedlung zeigte ebenfalls Zellkerne (Abb. 29). Die extrazelluläre Matrix entsprach der eines dezellularisierten Klappensegels vor der Endothelzellbesiedlung.

In der H&E Färbung des mit SMCs und Endothelzellen besiedelten Klappensegels konnten sowohl vereinzelte Zellnester als auch ein Zellmonolayer dargestellt werden (Abb. 30).

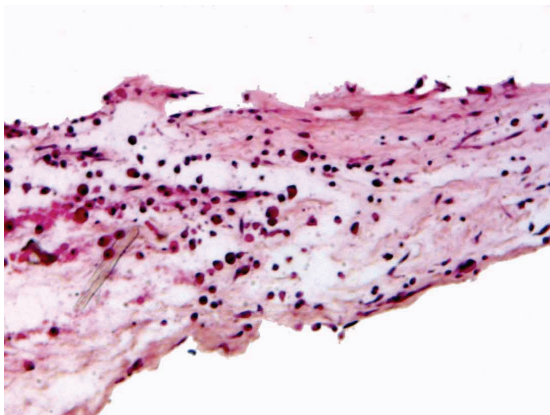


Abb. 28: H&E-Färbung nach SMC Besiedlung

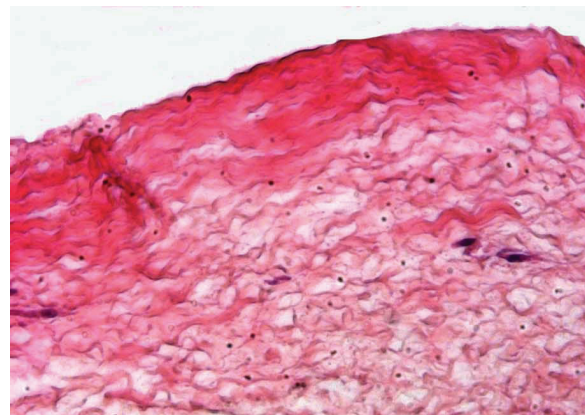


Abb. 29: H&E-Färbung nach EC Besiedlung

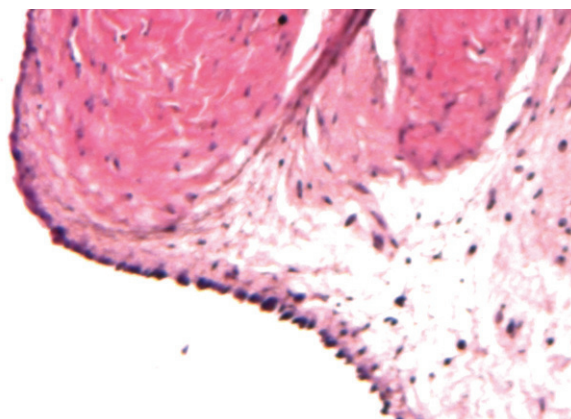


Abb. 30: H&E-Färbung nach SMC und EC Besiedlung

3.1.6 Zeitplan für die Herstellung eines Tissue engineernten klappentragenden Stents

Anhand der durchgeführten Versuche wurde ein Zeitplan für die Herstellung eines Tissue engineernten klappentragenden Stents erstellt. Dieser Zeitplan soll als Grundlage für weitere Versuchsreihen verwendet werden. Die Herstellung von *in vitro* besiedelten Stents hat mit der Entnahme der A. carotis und der Isolierung der Pirmärzellen begonnen. Die sich anschließende Kultivierung dauerte bezüglich beider Zelllinien 22 Tage. Für die Präparation und Fixierung von Klappe und Dünndarm mussten drei Tage und für die Dezellularisierung zwei Tage eingeplant werden. Mit Präparation und Dezellularisierung konnte so ab dem 17. Kultivierungstag begonnen werden, um einen nahtlosen Übergang zur Besiedlung zu gewährleisten. Die *in vitro*-Besiedlung erforderte noch mal 25 Tage. Insgesamt erstreckt sich der Herstellungsprozess von besiedelten klappentragenden Stents über 47 Tage. Die Herstellung von dezellularisierten klappentragenden Stents, die dann *in vivo* rebesiedelt werden können, konnte in fünf Tagen umgesetzt werden.

Zellisolierung/-kultivierung					Dauer in Tagen	Dauer in Tagen	
Carotis Entnahme + Anzucht		Tag 0					
Endothelzellen	14 Tage	1 T75	SMCs	14 Tage			2 T25
	16 Tage	2-3 T75		16 Tage			4 T25
	18 Tage	4-6 T75		18 Tage			2 T75
	20 Tage	8-10 T75		20 Tage			4 T75
				22 Tage			8 T75
				-	22		
					-	22	
Präparation							
Pulmonalklappen präparieren							
Dünndarmmukosa präparieren		1 Tag					
Klappe+Mukosa einnähen		1 Tag					
Inkubation in AB Lösung + Pbs		1 Tag					
					3	3	
					2	22	
Dezellularisierung							
Dezellularisierung		1 Tag					
Zelltrümmer auswaschen		1 Tag					
					2	2	
					5	22	
Besiedlung							
SMC Besiedlung - statisch -		6 Tage					
dynamische Besiedlung		16 Tage					
EC Besiedlung - statisch -		3 Tage					
					5	25	
					5	47	

Tab. 1: Zeitplan (■ Dauer für dezellularisierte Stents; ■ Dauer für *in vitro* besiedelte Stents)





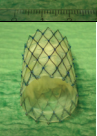
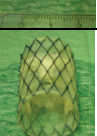
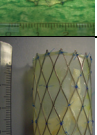
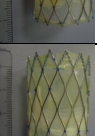
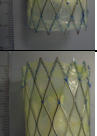
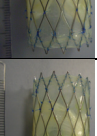
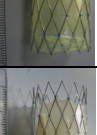
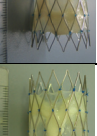
3.2 *In vitro*-Untersuchungen der klappentragenden Stents

Insgesamt wurden für diese Studie 24 Stents für den Einsatz am ovinen Modell gefertigt. Hierbei wurden Nitinol-Stents mit einem Durchmesser von 26 mm verwendet. Von diesen 24 Stents wurden 16 Stents mit vollständig umschlossenen Dünndarm (III-X) und 8 mit nicht vollständig umschlossenen Dünndarm (I,II,XI,XII) hergestellt.

Es wurden 22 dezellularisierte klappentragende Stents hergestellt. Im Tierversuch wurden 11 von diesen Stents eingesetzt, um *in vivo* rebesiedelt zu werden. Für jeden Tierversuch wurden hier zwei Stents gefertigt, um bei möglichen Beschädigungen oder Funktionseinschränkungen eines Stents nach der Dezellularisierung die Versuchsdurchführung gewährleisten zu können. Zwei klappentragende Stents (XII und XIII) wurden für den Einsatz am Tiermodell *in vitro* mit SMCs und ECs besiedelt. Hier wurde jeweils nur ein Stent besiedelt. Während Stent XIII im Tierversuch zu Einsatz kam, konnte Stent XII nicht implantiert werden, da das Tier vorher verstorben ist.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die hergestellten, für die Implantation vorgesehenen Stents. Diese insgesamt 24 klappentragenden Stents wurden mit nachfolgend beschriebenen *in vitro*-Untersuchungen evaluiert:

24 Stents wurden durch makroskopische Beurteilung, Messung der Expansionsfähigkeit und einen Suffizienztest mit physiologischer Kochsalzlösung auf ihre Qualität untersucht. Ein klappentragender Stent (IX a) wurde mittels einer *in-vitro* Testung im Kreislaufmodell auf seine Funktion untersucht. An drei klappentragenden Stents wurde zusätzlich eine mikrobiologische Untersuchung durchgeführt.

Stent	Durchmesser Nitinolstent	Tierversuchsnummer	Bild (für Tierversuch verwendeter Stent)
I a	26 mm	1	
I b			
II a	26 mm	2	
II b			
III a	26 mm	3	
III b			
IV a	26 mm	4	
IV b			
V a	26 mm	5	
V b			
VI a	26 mm	6	
VI b			
VII a	26 mm	7	
VII b			
VIII a	26 mm	8	
VIII b			
IX a	26 mm	9	
IX b			
X a	26 mm	10	
X b			
XI a	26 mm	11	
XI b			
XII	26 mm	x	
XIII	26 mm	1 B	

Tab. 2: Übersicht der gefertigten Stents (der jeweils implantierte Stent ist mit Fett gedruckter Ziffer aufgeführt)

3.2.1 Makroskopische Beurteilung

Einige Stents wiesen nach ihrer Herstellung Beschädigungen bzw. Fehler auf. Tabelle 3 gibt eine Übersicht dieser festgestellten Mängel.

Stent	Makroskopische Beurteilung
I a	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
I b	Loch in einem Klappensegel
II a	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
II b	Loch im Dünndarm
III a	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
III b	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
IV a	Ein Klappensegel schließt nicht vollständig
IV b	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
V a	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
V b	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
VI a	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
VI b	Loch in einem Klappensegel
VII a	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
VII b	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
VIII a	Loch in einem Klappensegel
VIII b	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
IX a	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
IX b	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
X a	Loch im Dünndarm und in einem Klappensegel
X b	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
XI a	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
XI b	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
XII	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen
XIII	Anatomie regelrecht und keine Beschädigungen

Tab. 3: Makroskopische Begutachtung der Stents

3.2.2 Expansionsfähigkeit

Mit diesem Testverfahren wurden die Innendurchmesser der klappentragenden Stents bei 3 °C und bei 37°C untersucht, um die Ausdehnungsfähigkeit zu beurteilen (Tab. 4). Im Mittel betrug der Durchmesser der klappentragenden Stents bei 3°C 24 mm und bei 37 °C 25,2 mm.

Stent	Durchmesser Nitinolstent in mm	Durchmesser 3 °C in mm	Durchmesser 37 °C in mm
I a	26	23,5	25
I b	26	22,5	24,5
II a	26	24	25,5
II b	26	23	25
III a	26	25	25,5
III b	26	24	24,5
IV a	26	22	24,5
IV b	26	25,5	26
V a	26	25	25,5
V b	26	24	25
VI a	26	23,5	25
VI b	26	24,5	26
VII a	26	24	24,5
VII b	26	24,5	25,5
VIII a	26	24	25
VIII b	26	25	26
IX a	26	23,5	25
IX b	26	22	24
X a	26	24,5	26
X b	26	25	26
XI a	26	24	25,5
XI b	26	24,5	25
XII	26	23,5	25
XIII	26	24	24,5

Tab. 4: Durchmesser der Stents bei 3°C und 37°C

Entscheidend für den Einsatz im Tierversuch war die Ausdehnungseigenschaft der klappentragenden Stents bei 37°C. Tabelle 5 zeigt die Abweichungen der Ist-Werte von den Soll-Werten. Fünf der Stents erreichten den Durchmesser der Nitinol-Stents von 26 mm. Somit erreichten insgesamt 20,8% der Stents ihren Sollwert zu 100%, 54,2% erreichten ihren Sollwert zu mind. 95% und 25% erreichten ihren Sollwert zu mind. 90%. Die prozentuale Abweichung vom Sollwert schwankte zwischen 0 und 7,7%. Im Mittel wurden $96,9 \pm 2,2\%$ des Sollwertes bei den Stents erreicht.

Stent	Durchmesser Nitinolstent in mm	Durchmesser bei 37 °C in mm	Abweichung vom Soll in mm	Ist Durchmesser in %	Abweichung vom Soll in %
I a	26	25	1	96,2	3,8
I b	26	24,5	1,5	94,2	5,8
II a	26	25,5	0,5	98,1	1,9
II b	26	25	1	96,2	3,8
III a	26	25,5	0,5	98,1	1,9
III b	26	24,5	1,5	94,2	5,8
IV a	26	24,5	1,5	94,2	5,8
IV b	26	26	0	100,0	0,0
V a	26	25,5	0,5	98,1	1,9
V b	26	25	1	96,2	3,8
VI a	26	25	1	96,2	3,8
VI b	26	26	0	100,0	0,0
VII a	26	24,5	1,5	94,2	5,8
VII b	26	25,5	0,5	98,1	1,9
VIII a	26	25	1	96,2	3,8
VIII b	26	26	0	100,0	0,0
IX a	26	25	1	96,2	3,8
IX b	26	24	2	92,3	7,7
X a	26	26	0	100,0	0,0
X b	26	26	0	100,0	0,0
XI a	26	25,5	0,5	98,1	1,9
XI b	26	25	1	96,2	3,8
XII	26	25	1	96,2	3,8
XIII	26	24,5	1,5	94,2	5,8
Mittelwert		25,2	0,8	96,9	3,1
Standardabweichung		0,6	0,6	2,2	2,2

Tab. 5: Abweichung des Ist-Durchmessers vom Soll-Wert

3.2.3 Suffizienztest mit physiologischer Kochsalzlösung

Die klappentragenden Stents wurden vor der Implantation einem Suffizienztest mit physiologischer Kochsalzlösung unterzogen (Tab. 6). Der Stent mit dem jeweils besseren Ergebnis wurde, sofern er keine Beschädigungen aufwies, für den Tierversuch verwendet. Alle getesteten Stents wiesen eine Wassersäule von mind. 45 s auf. Im Mittel wurde die

Flüssigkeitssäule für $117,5 \pm 33,88$ s gehalten. 62,5% hielten die Flüssigkeitssäule für mind. 120 s. 20,8 % hielten die Flüssigkeitssäule zwischen 90 und 115 s und 16,6% hielten die Säule zwischen 45 und 85 s.

Stent	Wassersäule in s
I a	100
I b	55
II a	125
II b	95
III a	130
III b	140
IV a	50
IV b	140
V a	130
V b	115
VI a	135
VI b	90
VII a	150
VII b	130
VIII a	70
VIII b	155
IX a	110
IX b	160
X a	45
X b	150
XI a	140
XI b	135
XII	145
XIII	125
Mittelwert	117,5
Standardabw.	33,88

Tab. 6: Ergebnisse Suffizienztest

3.2.4 Funktionstest am Kreislaufmodell

Ein Stent (IX a) wurde im Kreislaufmodell des Institutes für experimentelle und angewandte Physik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf seine Funktion und Strömungseigenschaften getestet. Die Klappe öffnete sich prompt in der Systole und schloss regelrecht in der Diastole. Mittels Drucksensoren wurde der Strömungswiderstand

(transvalvulärer Gradient) der Klappe gemessen (Tab. 7, Abb. 31). Die Druckverhältnisse lagen hier im Normbereich.

Das Maximum des tG wurde im Mittel bei $123,0 \pm 3,6$ ms erreicht. Es betrug durchschnittlich $19,83 \pm 0,96$ mmHg. Das Minimum des tG wurde im Mittel bei $463,7 \pm 4$ ms erreicht. Es betrug durchschnittlich $-50,6 \pm 3,2$ mmHg. Der Klappendifferenzdruck während der Diastole (325-900ms) betrug im Durchschnitt über 3 Messungen $-13,8 \pm 2,1$ mmHg.

[Zeit [ms]]	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Durchschnittswert
0	1,0	0,9	-0,4	0,5
25	3,4	3,3	2,4	3,0
50	7,3	7,7	7,1	7,4
75	13,0	13,7	13,1	13,3
100	17,7	18,9	18,2	18,3
125	18,7	20,7	20,0	19,8
150	16,2	18,8	18,2	17,7
175	9,6	12,1	11,6	11,1
200	0,2	2,3	1,8	1,5
225	-6,3	-4,9	-5,5	-5,6
250	-8,7	-7,7	-8,4	-8,3
275	-8,6	-7,8	-8,6	-8,4
300	-7,0	-6,4	-7,2	-6,8
325	-5,2	-4,7	-5,4	-5,1
350	-5,4	-4,9	-5,5	-5,3
375	-10,2	-9,5	-10,3	-10,0
400	-21,3	-20,3	-21,6	-21,1
425	-36,5	-35,6	-37,6	-36,6
450	-47,3	-47,4	-51,0	-48,6
475	-45,9	-47,8	-53,8	-49,2
500	-34,8	-37,8	-45,5	-39,4
525	-22,4	-25,2	-32,9	-26,8
550	-13,3	-15,5	-21,9	-16,9
575	-7,7	-9,2	-14,2	-10,4
600	-4,3	-5,4	-9,2	-6,3
625	-2,4	-3,3	-6,4	-4,0
650	-1,8	-2,3	-5,1	-3,1
675	-1,9	-2,2	-4,9	-3,0
700	-2,3	-2,5	-5,4	-3,4
725	-2,4	-3,0	-6,1	-3,8
750	-2,3	-3,5	-6,5	-4,1
775	-2,3	-4,1	-6,6	-4,3
800	-2,4	-4,4	-6,4	-4,4
825	-2,8	-4,4	-6,1	-4,4
850	-3,2	-4,0	-5,6	-4,3
875	-3,3	-3,5	-5,1	-4,0
900	-2,9	-2,9	-4,5	-3,4
925	-2,1	-2,0	-3,6	-2,6
950	-1,1	-1,0	-2,6	-1,5
975	-0,1	-0,1	-1,6	-0,6

Tab. 7: Klappendifferenzdruck in mmHg

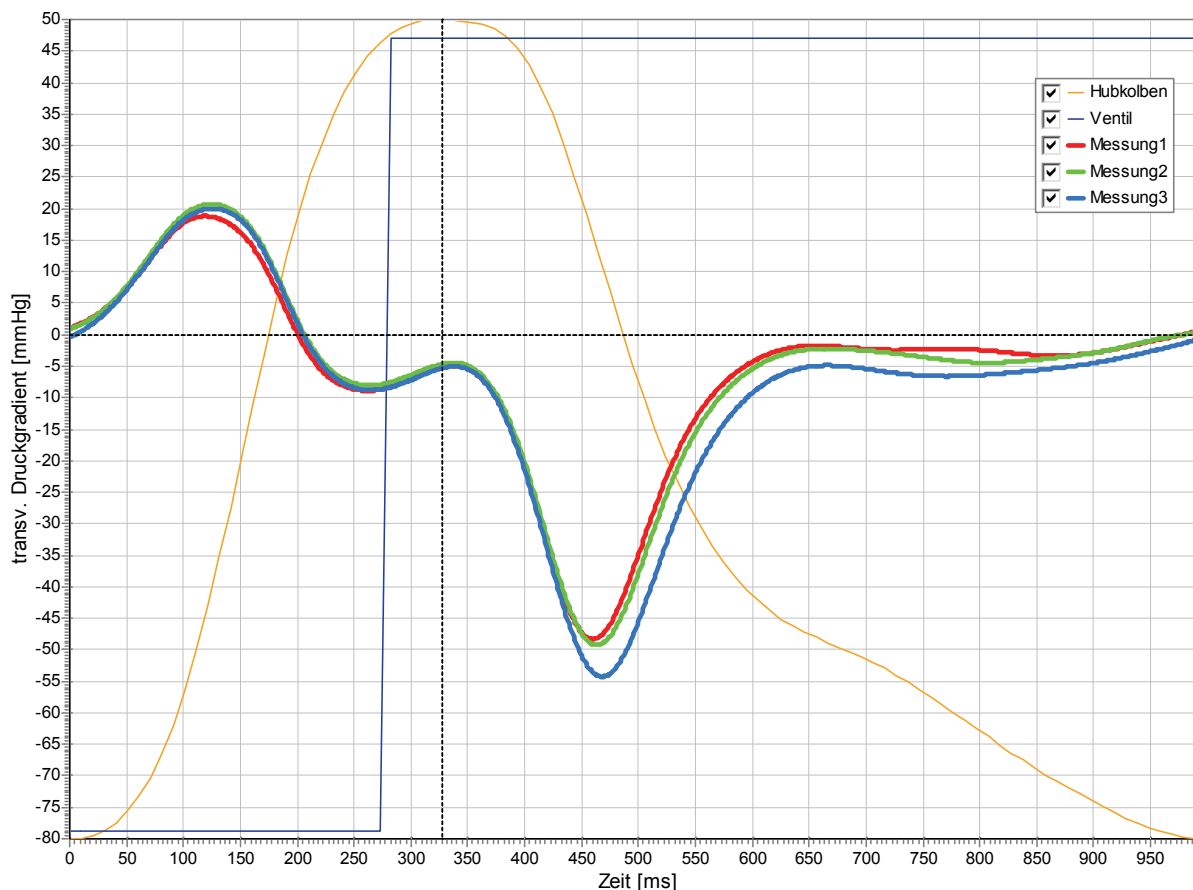


Abb. 31: Differenzdruck des klappentragenden Stents IXa

3.2.5 Mikrobiologische Abstriche

Die klappentragenden Stents Vb, VIIb und Xa wurden mittels eines Abstriches mikrobiologisch untersucht, um eine mögliche Kontamination mit Bakterien oder Pilzen nachzuweisen. Nach einer Erregeranzucht, -differenzierung und Resistenzbestimmung sowie einer Pilzanzucht und -differenzierung durch das Institut für Mikrobiologie und Virologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein zeigte sich bei den drei klappentragenden Stents kein Nachweis von Bakterien und/oder Pilzen.

3.2 Einsatz am ovinen Modell

3.3.1 Die Implantation

Insgesamt konnten 12 klappentragende Stents implantiert werden. 11 Versuchstieren wurde ein dezellularisierter klappentragender Stent mit dem Ziel der *in vivo*-Rebesiedlung und einem Schaf ein *in vivo* besiedelter Stent implantiert. Sämtliche klappentragende Stents passten in den vorgesehenen 22 French Applikationskatheter und konnten vollständig entfaltet werden.

3.3.2 Untersuchung der letalen Komplikationen

Sechs der zwölf Schafe haben bis zur geplanten Explantation überlebt (Schafe 2,5,6,7,11 und 12). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Tiere, Todeszeitpunkt und Todesursache.

Schaf-Nr.	Vorzeitiger Todeszeitpunkt	Todesursache
1	1. postop. Tag	Stentperforation
2	-	Euthanasie
3	intraoperativ	Stentperforation
4	intraoperativ	Stentfehllage
5	-	Euthanasie
6	-	Euthanasie
7	-	Euthanasie
8	1. postop. Tag	Stentfehllage
9	5. postop. Tag	Stentperforation
10	1. postop. Tag	Stentperforation
11	-	Euthanasie
12	-	Euthanasie

Tab. 8: Todeszeitpunkt und Todesursache

Zwei Schafe verstarben an einer, während des Applikationsvorganges verursachten, Stentfehllage am ersten postoperativen Tag. Bei den Versuchstieren 4 und 8 kam es durch diese Fehllage im rechten Ventrikel zu einem Papillarmuskelabriss der Trikuspidalklappe. Vier weitere Schafe verstarben intraoperativ oder am 1. bzw. 5 postoperativen Tag an den Folgen einer durch den Stent verursachten Perforation.

Bei den Versuchstieren 1, 9 und 10 wurde eine Herzbeutelamponade durch eine Perforation der Pulmonalarterie festgestellt. Bei Versuchstier 3 kam es ebenfalls zu einer Perforation der Pulmonalarterie. Bei allen verstorbenen Tieren konnten akute durch den Stent bzw. den Applikationsvorgang bedingte Todesursachen gefunden werden. 67 % der letal verlaufenden Komplikationen standen mit einer Stentperforation in Verbindung.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen der tierexperimentellen Studie „perkutaner Pulmonalklappenersatz und Tissue Engineering“ am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel unter Leitung von PD Dr. Lutter und in Kooperation mit PD Dr. Stock (Universität Tübingen). In dieser Dissertationsschrift wird der Herstellungsprozess von Tissue engineerten klappentragenden Stents und die bei deren *in vitro*-Evaluation gewonnenen Daten dargestellt und in diesem Kapitel diskutiert. Meine experimentellen Arbeiten für diese Studie erstreckten sich über einen Zeitraum von Januar 2006 bis Juni 2007. Durch die Ergebnisse der *in vivo*-Evaluation von Frau cand. med. Alkje Twellmaier (angiographische Beurteilung der Stentfunktion) und Herrn cand. med. Florian Ambrust (Hämodynamische Parameter) konnten weitere Rückschlüsse gezogen werden.

4.1 Die Herstellung der klappentragenden Stents

Lutter und Stock et al. verbinden als erste Arbeitsgruppe den Forschungsbereich des Tissue Engineering mit dem perkutanen Klappenersatz. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Auswahl eines geeigneten expandierbaren Stents für die Katheterapplikation und die Auswahl und Präparation einer geeigneten Herzklappe, die in den Stent eingebracht werden kann. Ein weiterer Schwerpunkt lag darauf, die Herzklappe für die *in vivo*-Rebesiedlung oder die *in vitro*-Besiedlung durch Dezellularisierungsverfahren entsprechend vorzubereiten, um das Einwachsen von autologen glatten Muskelzellen und Endothelzellen zu gewährleisten. So musste auch eine Methode zur Zellgewinnung und Kultivierung etabliert werden.

Auf diese Weise sollte ein klappentragender Stent entwickelt werden, der die Vorteile von Tissue engineerten Klappen gegenüber den kommerziell erhältlichen Herzklappen und die Vorteile der minimal invasiven Applikationsform gegenüber der konventionellen chirurgischen Operation miteinander vereint. Die einzelnen Bestandteile und Arbeitsschritte der Herstellung werden im Folgenden diskutiert.

4.1.1 Der selbstexpandierende Nitinol Stent

Für die Herstellung der klappentragenden Stents wurden Nitinol-Stents verwendet. Bereits seit 1996 verwendet die Arbeitsgruppe in Kiel selbstexpandierende Nitinol-Stents für den experimentellen perkutanen Klappenersatz. Durch seine Materialeigenschaften wie Formgedächtnis, Superelastizität, Korrosionsbeständigkeit und Biokompatibilität stellt der Nitinol Stent ein geeignetes klappentragendes Gerüst dar (79).

Ferrari et al. (Nitinolstent mit porciner Pulmonalklappe) und Zouh et al. (Nitinolstent mit boviner Jugularvene) konnten ebenfalls die erfolgreiche Applikation mit adäquaten

hämodynamischen Ergebnissen in einem Großtiermodell an Schweinen zeigen (80-82). Auch Segesser et al. setzten bei ihren Versuchen zum perkutanen Klappenersatz auf selbstexpandierende Nitinol Stents (83).

Eine Alternative zu den selbstexpandierenden Stents stellt der von Bonhoeffer et al. verwendete Platin-Iridium Stent dar, welcher mittels des Ballon-in-Ballon Verfahrens appliziert wird. Die auf dem Gebiet des perkutanen Klappenersatzes führende Arbeitsgruppe von Bonhoeffer konnte die erfolgreiche Anwendbarkeit sowohl in Großtierversuchen als auch an ersten menschlichen Patienten unter Beweis stellen (52;53;84-87).

Ballon-expandierbare Stents zeigen jedoch ein gewisses Risiko, da während des Applikationsvorgangs der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt (RVOT) durch den inflatierten Ballon verlegt wird. Dies kann zu einer Dilatation des rechten Ventrikels und einer Unterbrechung der Lungenperfusion führen. Da der Stent soweit entfaltet wird wie der Ballon und nicht wie es die anatomische Gegebenheit des RVOT vorgibt, kann der Expansionsdruck zu einer Schädigung des in diesem Bereich besonders vulnerablen Gewebes führen. Zusätzlich kann es zu einer Schädigung der Klappensegel während der Applikation kommen, was eine mögliche Funktionseinschränkung der Klappen nach sich zieht. Die erstmals von unserer Arbeitsgruppe und auch in dieser Studie verwendeten selbstexpandierenden Nitinol-Stents zeigen im Vergleich zu den genannten Risiken Vorteile. So wird der RVOT nicht verlegt, der geringere Expansionsdruck schont das umliegende Gewebe und eine Schädigung der Klappen wird vermieden. Besonders von Vorteil sind die permanent radiär wirkenden Kräfte des Nitinol-Stents (88). So konnte eine Studie unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass diese Eigenschaft einer Migration der Prothese durch Bewegungen des Herzens und der Pulmonalarterie entgegenwirkt (74). Auch die dreimal geringere Steifigkeit der Nitinol-Stents gegenüber den Ballon-expandierbaren-Stents wirkt sich günstig auf die Compliance des Ausflusstraktes aus (89).

4.1.2 Der ovine Dünndarm

Um die in dem Stent fixierte Klappe zu schützen, wurde der Stent in dieser Studie mit ovinen Dünndarm von innen ausgekleidet.

In einer vorausgehenden Studie unserer Arbeitsgruppe wurden die Stents für den perkutanen Pulmonalklappenersatz mit bovinen Jugularvenen bestückt (75;78). Da ganze Venensegmente eingenäht wurden, waren die Venenklappen bereits durch die eigene Venenwand geschützt und kamen nicht in direkten Kontakt mit dem Nitinol-Stent. Um einer Schädigung der porcinen Pulmonalklappe während der Kompression im Katheter vorzubeugen, wurde folglich nach einer geeigneten Methode gesucht.

Die Arbeitsgruppe von Stock et al. untersuchte die Möglichkeit des Schutzes durch an den Stent fixierten ovinen Dünndarm (90). Hierfür wurden klappentragende Stents mit von innen angebrachtem Dünndarm gegenüber klappentragenden Stents mit von außen angebrachtem Dünndarm verglichen. Nach Kompression und Einsatz in einem Applikationskatheter wurden die Klappen histologisch und elektronenmikroskopisch analysiert. Die Klappen der von innen ausgekleideten Stents zeigten dabei im Gegensatz zu den von außen ausgekleideten Stents keine Schädigung des Gewebes.

Der Dünndarm zeigte in unseren Versuchen gute Verarbeitungs- und Anwendungsqualitäten. Anfängliche Schwierigkeiten bei der Präparation und der Fixation konnten schnell überwunden werden. Nachdem die Dünndarmmukosa mit einem Skalpell entfernt wurde ließ sich der Dünndarm mittels NaCl und Ethanol sehr gut weiter verarbeiten und konnte problemlos fixiert werden. Aufgrund der Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Stock et al. und den guten Erfahrungen in unseren eigenen Versuchen, schien uns die Verwendung von ovinem Dünndarm eine gute Möglichkeit darzustellen, die Pulmonalklappe während der Kompression im Katheter zu schützen.

4.1.3 Die porcine Pulmonalklappe

Als geeignete Klappen wählten wir porcine Pulmonalklappen. In ihrer Anatomie sind sie den menschlichen Herzklappen sehr ähnlich, und werden bei kommerziellen Bioprothesen für den Herzklappenersatz seit 1987 erfolgreich verwendet (29). Ein weiterer Vorteil ist die unproblematische Verfügbarkeit von Schweineherzen, so dass eine ausreichende Menge an Herzklappen für unsere Studienzwecke gewährleistet werden konnte. Gute Ergebnisse bei Besiedlungsversuchen von porcinen Pulmonalklappen als dezellularisierte Klappengerüste von Steinhoff et al. (48) waren ebenfalls ein Kriterium für unsere Entscheidung.

Um die klappentragenden Stents überhaupt in einen Applikationskatheter laden zu können, musste die Klappe bezüglich der umgebenden Muskelschicht und des Gefäßabschnittes maximal verdünnt werden. Diese Reduzierung von Gewebe stellte so einen wesentlichen Bestandteil der Präparation dar. Die Präparation erbrachte in unseren Versuchen suffiziente und auf ein Minimum reduzierte Pulmonalklappen. Die Verfahrensweise mittels mikrochirurgischer Federschere, Skalpell und Pinzette zeigte dabei gute Ergebnisse. Das umliegende Klappengewebe konnte auf diese Weise ausreichend reduziert werden, um einen Kathetereinsatz zu gewährleisten.

4.1.4 Bewertung der Prototypen

Die 10 gefertigten Prototypen zeigten gute Ergebnisse bei dem Kathetertest mit anschließender Suffizienztestung. Sie ließen sich problemlos zusammenfalten und in den 22 French Applikationskatheter schieben. Somit konnte das Ausmaß der Gewebereduktion während der Präparation als erfolgreich gewertet werden. Auch nach dem Kathetereinsatz konnten die Prototypen eine Flüssigkeitssäule im Mittel für 101 s halten, was von uns als suffizient gewertet wurde. Zusammenfassend kann man vermuten, dass der Applikationsvorgang mittels Kathetersystem keinen wesentlichen negativen Einfluss auf die Funktionstüchtigkeit und Suffizienz der klappentragenden Stents besitzt.

4.1.5 Herstellung eines Klappengerüsts für eine *in vitro*-Besiedlung oder *in vivo*-Rebesiedlung

Ein für das Tissue Engineering benötigtes Grundgerüst sollte so konstruiert sein, dass es eine gute und dauerhafte Zellbesiedlung ermöglicht und mechanische Stabilität gewährleistet, bis neu gebildetes Gewebe diese Funktion übernehmen kann (91).

Einerseits kann das Gerüst aus bioabsorbierbaren synthetischen Materialien gefertigt werden und andererseits kann eine biologische Matrix menschlichen oder tierischen Ursprungs verwendet werden.

Shinoka et al. zeigten, dass es möglich ist, Herzklappensegel aus Polyglykolsäure anzufertigen (41). Dieses Gerüst hatte jedoch den Nachteil, zu schnell resorbiert zu werden. Die *in vitro* besiedelten Zellen hatten nicht die Möglichkeit ein stabiles Gerüst aufzubauen, so dass dieses Gerüst nicht in der Lage war, physiologischen Belastungen langfristig standzuhalten. Hoerstrup et al. führten eine zusätzliche Beschichtung mit Poly-4-hydrobutyrat durch, mit der Absicht, die Stabilität des Gerüsts zu verbessern (92). Auch dieses Gerüst erwies sich im Tierversuch als nicht suffizient. Ein weiterer Nachteil dieser künstlichen Matrices ist, dass wichtige extrazelluläre Matrixproteine fehlen, wie z.B. Kollagen, Elastin oder Proteoglykane, die für die Verbindung der Matrix mit den zellulären Bestandteilen des Gewebekonstruktes verantwortlich sind (93;94). Zusätzlich scheint das Kollagen für eine langfristige Klappenfunktion notwendig zu sein (95).

Der von unserer Arbeitsgruppe verwendete Ansatz, eine biologische Klappe von allen Zellen zu befreien und als Klappengerüst für eine Besiedlung zu nutzen, scheint eine gute Alternative zu sein (40). Steinhoff und Stock et al. zeigten in einem Tierversuch bereits die Verwendung von dezellularisierten xenogenen Klappengerüsten und deren Wiederbesiedlung mit autologen Zellen (48). Auch Leyh et al. konnten mit der Besiedlung von azellulären Pulmonalklappen

funktionsfähige Klappenkonstrukte herstellen (49). Ein großer Vorteil eines derartigen Gerüsts ist die Anwesenheit von Kollagen, Elastin und Proteoglykanen. Des Weiteren sind die komplexen anatomischen Strukturen wie natürliche Herzklappensegel und Sinus Valsalva bereits vorhanden und müssen nicht durch aufwendige Methoden nachgebaut werden. In einer Studie von Robicsek wurde der wichtige Einfluss dieser Strukturen auf das Schließverhalten von Herzklappen demonstriert (96).

Neben der *in vitro*-Besiedlung mit autologen Zellen können die azellulären xenogenen Klappen auch ohne vorhergehende Wiederbesiedlung implantiert werden. Hierbei wird gehofft, dass eine Besiedlung mit Zellen des Empfängers, die von angrenzenden Geweben oder im Blut zirkulierenden Endothelzellen ausgeht, stattfindet. Im Rahmen unserer Studie wurde bisher 11 Schafen ein dezellularisierter klappentragender Stent mit dem Ziel der *in vivo*-Rebesiedlung und einem Schaf ein *in vitro* besiedelter Stent implantiert.

In bereits angelaufenen Folgeversuchen werden nun weitere *in vitro* besiedelte Stents implantiert und evaluiert, um beide Möglichkeiten der Wiederbesiedlung miteinander zu vergleichen.

4.1.6 Die Dezellularisierung

Um sämtliche Zellen aus der Spenderklappe zu entfernen, stehen verschiedene chemische oder enzymatische Methoden der Dezellularisierung zur Verfügung. Gemeinsames Ziel ist es, ein weitgehend unverändertes extrazelluläres Grundgerüst der Herzklappe herzustellen.

Eine Möglichkeit stellt die Dezellularisierung mit Aqua dest. dar. Durch osmotische Prozesse sollen die Zellen in der extrazellulären Matrix zum Platzen gebracht werden. Ichikawa et al. dezellularisierten auf diese Weise Venensegmente als Ersatz für die rechte Pulmonalarterie. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Struktur der extrazellulären Matrix durch Aufquellung verändert wird (97). Eine weitere Dezellularisierungsmethode wird von Meezan et al. beschrieben. Sie beruht auf einer Inkubation des Gewebes in einer Natriumdesoxycholat-Natriumazid-Lösung und fand in Variationen bereits Anwendung zur Dezellularisierung von Aorten und Herzklappen (98). Bei der Verwendung von Detergentien zur Dezellularisierung stehen noch Triton-X-100 und Natrium-Dodecylsulfat zur Verfügung. Bei der Dezellularisierung porciner Aortenklappen mit der Detergentie Triton-X-100 erhielten Grauss et al. vollständig azelluläre Gewebe. Die Dezellularisierung führte jedoch zu einem Verlust der Kollagenstruktur (95). Bei der Dezellularisierung von humanen Venensegmenten mittels Natrium-Dodecylsulfat konnten 94 % der Zellen entfernt werden. Die Kollagenstruktur der Matrix blieb unverändert, wobei die Elastinstruktur Veränderungen aufwies (99). Implantationsergebnisse sind bisher jedoch nicht veröffentlicht worden.

Die von uns favorisierte enzymatische Dezellularisierungsmethode mittels Trypsin und EDTA hat sich bereits für Herzklappen und Gefäße im porcinen System etabliert. Im Leibnitz Forschungslabor für Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO, Medizinische Hochschule Hannover) wurde ein Arbeitsprotokoll zur Dezellularisierung von porcinen Blutgefäßen und Herzklappen auf Basis der Trypsin/EDTA Behandlung entwickelt (48).

Auch in anderen Studien wurde die erfolgreiche Anwendung dieses Verfahrens demonstriert. Steinhoff et al. konnten eine vollständige Dezellularisierung von porcinen Pulmonalklappen bei erhaltenem Kollagenetzwerk erzielen (48). Von Cebotari et al. wurde die Trypsin/EDTA-Methode zur Zellentfernung bei menschlichen Herzklappen eingesetzt. Nach der Dezellularisierung konnten histologisch keine Zellen mehr nachgewiesen werden. Eine DNA-Analyse zeigte, dass der DNA-Gehalt um mehr als 98 % reduziert werden konnte. Gleichzeitig aber blieb auch hier die extrazelluläre Struktur der Klappensegel erhalten. Das dreidimensionale Netzwerk von Kollagenfasern wurde durch die Dezellularisierung nicht beeinflusst, was durch Konfokalmikroskopie bewiesen wurde (100). Um die Funktionalität einer Herzklappe nicht zu beeinträchtigen und gleichzeitig gute Ergebnisse zu erzielen, schien uns diese Art der Dezellularisierung somit am besten geeignet zu sein.

Schencke-Layland et al. konnten in einer Studie zeigen, dass die Dezellularisierung mit Trypsin/EDTA zeitabhängig zu einem Verlust der Zellen, der Extrazellulärbestandteile und der biomechanischen Funktionalität der Klappe führt (101). Die angemessene Dauer der Dezellularisierung ist somit elementar. Auf der einen Seite muss die Klappe lange genug in Trypsin/EDTA inkubiert werden um alle Zellen zu entfernen, so dass eine immunologische Abstoßungsreaktion verhindert werden kann. Auf der anderen Seite darf nicht zu lange dezellularisiert werden, um die Struktur der extrazellulären Matrix nicht zu beschädigen und damit die Funktionsfähigkeit der Klappe zu mindern. Um diese gegenläufigen Bedingungen zu erfüllen wurde von Schencke-Layland et al. eine 24-stündige Dezellularisierung als angemessen ermittelt (101). Die Dezellularisierungsversuche mit verschiedenen Inkubationszeiten in dieser Arbeit (24, 36 und 48 h) konnten eine optimale Inkubationsdauer von 24 h bestätigen.

4.1.7 Gewinnung und Kultivierung der Primärzellen

Parallel zur Herstellung des azellulären Klappengerüsts mussten autologe Zellen isoliert und expandiert werden, um eine *in vitro*-Besiedlung zu ermöglichen. Für die Gewinnung geeigneter Zellen sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben. Als neuester Ansatz für das Tissue Engineering von Herzklappen ist die Verwendung von Vorläuferzellen bzw. Stammzellen verschiedenen Ursprungs zu erwähnen. Stamm et al. konnten durch die Besiedlung von

Matrixgerüsten mit Zellen aus Nabelschnurblut funktionstüchtige Herzklappen herstellen (102). Auch Sodian et al. ist es gelungen mit Zellen aus Nabelschnurgefäßen eine *in vitro*-Besiedlung von Herzklappen durchzuführen (103). Rezai et al. hingegen isolierten für die Herstellung kardiovaskulärer Gewebe adulte Stammzellen aus dem Knochenmark (104).

Eine weitere sich bereits bewährte Methode stellt die Zellgewinnung aus arteriellen und venösen Gefäßen dar. In zahlreichen Versuchen anderer Arbeitsgruppen konnten auf diese Weise autologe Zellen für eine *in vitro*-Besiedlung gewonnen werden (45;48;92;105). Um dabei eine möglichst natürliche Zellschichtung der Klappe zu erreichen, wurden Endothelzellen und proliferationsfähige Zellen der Media (glatte Muskelzellen) isoliert und kultiviert. Die Endothelialisierung der Klappen soll das Risiko von Thrombosen, Infektionen oder Degenerationen durch Kalzifizierung verringern (100). Die glatten Muskelzellen sollen als interstitielle Zellen die extrazelluläre Matrix stabilisieren und die Adhäsion der Endothelzellen begünstigen (106).

Bei der Wahl für eine geeignete Zellquelle entschieden wir uns aufgrund der erfolgreich beschriebenen Ergebnisse aus anderen Studien für Endothelzellen und glatte Muskelzellen. An kryokonservierten Endothelzellen und glatten Muskelzellen, die die Arbeitsgruppe von Stock et al. aus Arteriensegmenten von Schafen isoliert hatte, wurden von uns erste Kultivierungsversuche gestartet, um einen optimalen Vermehrungsprozess zu etablieren. In weiteren Versuchen wurde dann aus einer A. carotis des geplanten Empfängertieres zunächst Endothelzellen und im zweiten Schritt glatte Muskelzellen isoliert und kultiviert.

Endothelzellen konnten bisher aus Arterien, Venen, Herzklappen sowie aus omentalem- und subkutanem Fettgewebe gewonnen werden (107). Das Ausgangsgewebe sollte eine Ähnlichkeit zum hergestellten Gewebe besitzen, da sich Endothelzellen unterschiedlicher Gewebe nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell voneinander unterscheiden (107). Für die Gewinnung der glatten Muskelzellen kam am ehesten ein Arteriensegment in Frage, da die Zellausbeute bei venösen Gefäßen geringer ausfällt (108). Um möglichst mit einer Gewebeentnahme beim geplanten Empfängertier auszukommen haben wir uns folglich für die A. carotis entschieden.

Um die benötigten Endothelzellen aus einem Arteriensegment zu isolieren, stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen die Eversion, bei der die Arterie auf einem Edelstahlstab umgestülpt wird und anschließend in Enzymlösung inkubiert wird und zum anderen die Kanülierung, bei der die Enzymlösung (0,2 %ige Collagenase-A-Lösung) in die mit einer Naht verschlossenen Arterie eingefüllt wird. Da Bourke et al. zeigen konnten, dass die Kanülierung der Eversion hinsichtlich der Zellausbeute überlegen ist (109), verwendeten

wir in unseren Versuchen diese Methode. Die Inkubation der Arterie erfolgte für 20 min in einer 0,2 %igen Collagenase-A-Lösung. Tiwari et al. empfehlen eine Inkubationszeit zwischen 10 und 30 min (107). In dieser Arbeit verwendeten wir die auch von Teebken et al. beschriebene Inkubationszeit von 20 min (110), die zu einer guten Zellausbeute führte.

Die weitere Kultivierung der Endothelzellen erfolgte unter Kontrolle der Zellzahl und Vitalität problemlos. Nach 5-6 Passagen und 19 bis 20 Tagen konnte bis zur erforderlichen Menge von 8 T75 Flaschen vermehrt werden.

Die Isolierung der glatten Muskelzellen erfolgte durch in Medium inkubierte Gefäßstückchen. Auch Zund et al. konnten auf diese Weise konfluente Zellrasen bilden (111). Da glatte Muskelzellen langsamer wachsen als Endothelzellen, konnten erst nach fünf Tagen erste auswachsende Zellen beobachtet werden. Obwohl die Anzucht der glatten Muskelzellen in der Initial-Phase deutlich länger dauerte, konnte die Anzahl von acht T75 Flaschen jedoch auch nach 5-6 Passagen und durchschnittlich 22 Tagen erreicht werden.

Insgesamt konnte die Zellisolierung und Kultivierung in unseren Versuchen erfolgreich umgesetzt werden.

4.1.8 Die *in vitro*-Besiedlung

Minuth et al. und Nerem et al. konnten demonstrieren, dass durch mechanische Stimuli und physikalische Signale das Wachstum von Zellen und Gewebe verbessert werden kann (112;113). Dieser Umstand führte zu der Entwicklung von Bioreaktorsystemen, in denen die Konstrukte aus Matrix und aufbrachten Zellen pulsativen Fluss- und Druckkräften ausgesetzt werden. Dadurch soll eine funktionsspezifische Umgebung geschaffen werden, in der die hergestellten Gewebe präkonditioniert und an die späteren *in vivo*-Bedingungen gewöhnt werden (45;114). Um eine gute Anhaftung der glatten Muskelzellen mit Migration in die Klappengerüste und den Aufbau einer bindegewebigen Grundsubstanz und damit auch eine geeignete Adhäsionsmöglichkeit für die Endothelzellen zu erreichen, wurden in unseren Versuchen die klappentragenden Stents nach der statischen Aufbringung der glatten Muskelzellen in das speziell entwickelte Bioreaktorsystem installiert. Die 16-tägige dynamische Kultur wurde von den Klappen hinsichtlich der mechanischen Belastung gut toleriert und die H&E-Färbung des mit glatten Muskelzellen besiedelten Stents zeigte deutlich vorhandene Zellen. Stock et al. und Schencke-Layland et al. verglichen ein ähnlich angelegtes dynamisches Besiedlungsverfahren mit einem rein statischem Besiedlungsverfahren (42;45). Die unter dynamischen Bedingungen mit Myofibroblasten besiedelten Schweineherzklappen zeigten bezüglich einer kontinuierlichen Zunahme an Zellmasse, Kollagen und Elastin und auch der mechanischen Belastbarkeit deutlich bessere Ergebnisse.

Bei der von uns angefertigten H&E-Färbung des mit glatten Muskelzellen und Endothelzellen besiedelten Klappensegels zeigten sich im Vergleich zu der reinen EC-Besiedlung und SMC-Besiedlung mehr Zellnester und ein dichter Zellmonolayer. Zwar konnten keine differenzierten Aussagen zu den beiden Zelltypen getroffen werden, da die H&E Färbung unspezifisch ist, doch könnte dies ein Hinweis auf einen begünstigenden Einfluss der glatten Muskelzellen und der dynamischen Kultur auf die Endothelzelladhäsion sein.

4.1.9 Bewertung des gesamten Entwicklungsprozesses

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten zahlreichen Versuchsschritte können grob in Präparation, Einbringung in den Stent, Zellkultivierung, Dezellularisierung und Besiedlung gegliedert werden. Die Etablierung eines geeigneten Präparationsvorganges hat hier einen besonderen Stellenwert eingenommen. 50 porcine Pulmonalklappen wurden für Präparationsversuche verbraucht. Auch die Präparation und Fixierung des ovinen Dünndarms musste bis zur optimalen Umsetzung durch zahlreiche Versuche erarbeitet werden.

Die Etablierung und Handhabung des Dezellularisierungsverfahrens stellte sich unproblematisch dar. Auch die Zellkultivierung funktionierte und zeigte gute Ergebnisse. Die Einrichtung eines *in vitro*-Besiedlungsvorganges konnte durch die Kooperation mit Stock et al. und dem von der Universität Jena entworfenen Bioreaktor schnell realisiert werden.

Die Herstellung und Implantation von dezellularisierten Stents, die *in vivo* rebesiedelt werden sollen, konnte erfolgreich umgesetzt werden. Auch der Herstellungsprozess von *in vitro* besiedelten Stents scheint nach unserem Vorgehen umsetzbar zu sein. Die routinemäßige Herstellung und Implantation muss sich noch in folgenden Versuchsreihen beweisen.

4.1.10 Zeitplan für die Herstellung Tissue engineerter Herzklappen

Um einen effizienten Zeit- und Arbeitsplan für die Herstellung von TE-Herzklappen aufstellen zu können, wurden sämtliche Schritte von der Präparation über die Zellkultivierung und Dezellularisierung bis hin zur Besiedlung zeitlich analysiert.

Schon mit Beginn der Herstellung von *in vitro* besiedelten Klappenstents wird ein bestimmtes Versuchstier für die Implantation festgelegt, da die aus der A. carotis gewonnenen Zellen vom geplanten Empfängertier stammen müssen. Die Herstellung beginnt so mit der Entnahme der Arterie und endet mit der perkutanen Implantation. Unsere Versuche konnten zeigen, dass dieser Prozess nach unserem Vorgehen 47 Tage dauert. Besonders die Isolierung, Kultivierung und Besiedlung von autologen Zellen stellen aufwendige Verfahren dar, die durch mögliche Fehlerquellen wie mangelnde Zellausbeute, fehlendes Wachstum und Kontaminierung schnell gefährdet sind. Zusätzlich ist zu beachten, dass jedes Versuchstier zwei Operationen unterzogen

werden muss, was für das einzelne Tier und damit auch für eine erfolgreiche Langzeituntersuchung ein Risiko darstellt. In jedem Arbeitsschritt, bis auf die der Präparation und Dezellularisierung, könnte bereits ein Fehler den gesamten Zyklus für ein Versuchstier gefährden. Aufgrund dieser Risiken ist es umso wichtiger, die vielen Arbeitsschritte in einem konkreten zeitlichen Versuchsablauf zu strukturieren, um so zusätzliche Fehler zu vermeiden. Den Herstellungsprozess von 47 Tagen in ein Großtiermodell zu integrieren, stellt zusätzlich eine Herausforderung dar, da die Tiere bei der Implantation nicht zu groß sein dürfen (s 4.3.1). Für klappentragende Stents, die nur dezellularisiert und anschließend *in vivo* rebesiedelt werden sollen, ist der Herstellungsprozess deutlich kürzer und weniger aufwendig. Sowohl die Zellisolierung und -kultivierung als auch die Besiedlung entfallen. Die Herstellung dauert so nur fünf Tage. Auch ist der einzelne gefertigte Stent vor seiner Implantation nicht an ein bestimmtes Versuchstier gekoppelt. Der Aufwand und die Anfälligkeit der Versuchsplanung und -durchführung sind dadurch deutlich geringer.

Vor allem für die Herstellung von *in vitro* besiedelten klappentragenden Stents ist somit ein gut koordinierter Versuchsaufbau und eine zeitlich abgestimmte Planung von großer Bedeutung. Der hier aufgestellte Zeitplan kann dabei in erster Linie der logistischen Koordinierung von Beschaffung und Haltung der Versuchstiere und auch der Festlegung der OP-Termine als Grundlage dienen. Der in dieser Arbeit entworfene Zeit- und Arbeitsplan konnte bereits als Versuchsprotokoll für die nachfolgende Studie von PD Dr. Lutter eingesetzt werden.

4.2 *In vitro*-Untersuchungen der klappentragenden Stents

4.2.1 Makroskopische Beurteilung

Sämtliche Stents wiesen vor der Dezellularisierung keine sichtbaren Beschädigungen oder Funktionseinschränkungen auf. Die bei sechs Stents aufgetretenen Mängel könnten entweder allein durch die Dezellularisierung oder durch Mikrodefekte (durch Schere, Skalpell oder Nahtmaterial), welche sich durch die Dezellularisierung vergrößerten, verursacht worden sein. In unseren Versuchen zeigte sich trotz großer Sorgfalt und zunehmender Routine bei der Präparation kein absteigendes Auftreten dieser Beschädigungen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Defekte allein durch die Dezellularisierung verursacht wurden. Schlussfolgernd scheint die Strategie sinnvoll zu sein, zwei dezellularisierte klappentragende Stents pro *in vivo*- bzw. *in vitro*-Besiedlung herzustellen, um auf diese Weise auftretende Mängel zu kompensieren.

4.2.2 Expansionsfähigkeit

Im Mittel betrug der Innendurchmesser der klappentragenden Stents bei 37°C 25,2 mm. Nur 20,8 % der klappentragenden Stents erreichten ihren Soll-Durchmesser. Dies kann zum einen an dem geringeren Durchmesser der eingenähten porcinen Pulmonalklappe liegen und zum anderen an dem von innen fixierten Dünndarm, der möglicherweise durch eine gewisse Spannung nicht die vollständige Expansion des Stents zulässt.

In unserer Studie wurde bei den Versuchstieren der Sinus-Pulmonalis-Durchmesser als wichtiger Parameter für die Entfaltung und Anpassungsfähigkeit des Stents an seine Umgebung gemessen (siehe Dissertationsschrift von Alkje Twellmaier). Dieser Wert repräsentiert die Klappenebene und ist so von großer Bedeutung für die Größe der zu implantierenden Stents. Bei den 12 Schafen betrug er im Mittel 22,5 cm. Dieser Wert zeigt, dass der Expansionsdurchmesser der gefertigten Stents, trotz der Abweichung vom Sollwert bei 37°C ausreichend war ($25,2 > 22,5$ mm). Solange der Sinus Pulmonalis Durchmesser geringer als der Stentdurchmesser bei 37°C ausfällt, können die klappentragenden Stents noch radiäre Kräfte ausüben, um einer möglichen Migration vorzubeugen. Die Auswertungen zu dem Migrationsverhalten von Frau cand. med. Twellmeier konnten das bestätigen und zeigten gute Ergebnisse.

Versuche unserer Arbeitsgruppe mit bovinen Jugularvenen bestückten Stents zeigten bei einem Sollwert der Nitinol-Stents von 24 mm einen im Mittel erreichten Durchmesser von 21,8 mm (115). Die Limitation dieser Stents lag in der stark eingeschränkten Expansionsfähigkeit bedingt durch den zu geringen Innendurchmesser der Venensegmente. Patienten mit einer operativ korrigierten Fallot'schen Tetralogie, weisen in ihrer zweiten bis dritten Lebensdekade, in der eine perkutane Implantation von Vorteil sein könnte, häufig einen dilatierten RVOT von mindestens 22 mm auf (85). Die Verwendung von bovinen Jugularvenenklappen wäre dort beispielsweise nicht ohne weiteres möglich. Andere Arbeitsgruppen beschrieben ebenfalls die Notwendigkeit eines ausreichenden Innendurchmessers und die Problematik mit bovinen Jugularvenenklappen (60;116). Die in dieser Arbeit verwendeten Pulmonalklappen und die damit erreichte Steigerung der Expansionsfähigkeit bei 37°C könnten diese Limitation beseitigen und stellen somit eine sinnvolle Weiterentwicklung dar.

4.2.3 Suffizienztest mit physiologischer Kochsalzlösung

Der Suffizienztest mit physiologischer Kochsalzlösung stellte eine gute Methode dar, die klappentragenden Stents einer ersten und schnell durchführbaren Qualitätsprüfung zu unterziehen. Dieser Test simulierte auf einfache Weise die spätere Funktion. Die Ergebnisse sind als sehr gut zu interpretieren, da die Flüssigkeitssäule im Mittel für $117,5 \pm 34$ s gehalten

werden konnte. Vergleichend dazu zeigten die bovinen Jugularvenen tragenden Stents aus der vorausgegangenen Versuchsreihe eine Flüssigkeitssäule von deutlich kürzerer Dauer. Nur 8 von 25 Stents konnten eine Flüssigkeitssäule länger als 3 s halten. Dies demonstriert das enorme Potential der verwendeten Pulmonalklappen. Sechs der Stents zeigten korrelierend mit schlechten Ergebnissen von ≤ 100 sec bei dem Suffizienztest in der makroskopischen Begutachtung entsprechende Beschädigungen.

Die insgesamt guten Ergebnisse der dezellularisierten Stents legen nahe, dass der von uns durchgeführte Dezellularisierungsvorgang die Funktionalität der Klappen nicht wesentlich belastet. Die besiedelten Stents zeigten im Vergleich zu den dezellularisierten Stents keine Unterschiede, was darauf hindeutet, dass der Besiedlungsvorgang keinen negativen Einfluss auf die Funktionalität der Klappen ausübt.

4.2.4 Funktionstest am Kreislaufmodell

Die exemplarische Testung eines klappentragenden Stents am Kreislaufmodell von Herrn Dr. rer. nat. Steiner lieferte genaue Daten zum Verhalten der Klappen bei Druck- und Strömungsbedingungen, wie sie auch im rechten Herzen vorkommen. Die Messungen zeigten, dass die xenogene, dezellularisierte Pulmonalklappe diesen Druckverhältnissen standhalten könnte. Die Messwerte entsprachen denen einer kommerziellen biologischen Klappe (117).

4.2.5 Mikrobiologische Abstriche

Die mikrobiologischen Abstriche zeigten weder eine Kontamination mit Bakterien noch mit Pilzen. Diese Ergebnisse lassen sich wahrscheinlich auf die erfolgreiche Antibiotika-Inkubation zurückführen. Auch andere Arbeitsgruppen weisen auf die Vorteile hin, xenogene Herzklappen vor ihrer Weiterverwendung in einer Antibiotika-Lsg. zu inkubieren. (100;118).

4.3 Der Einsatz am ovinen Modell

4.3.1 Das Tiermodell

Nach der anfänglichen Verwendung von Hunden, Kälbern, Schweinen und Nagern als Versuchstiere auf dem Gebiet der Herzklappenchirurgie, setzte sich das Schaf als Tiermodell der Wahl durch (119). Schafe sind leicht zu handhaben, und die Wachstumsdynamik von Herz und großen Gefäßen entspricht weitgehend der des Menschen (47).

Weiterhin beschreiben zahlreiche Arbeitsgruppen, welche xenogene Klappentransplantationen am Schaf durchführen, dass vor allem im wachsenden Schaf über einen kurzen Zeitraum ausgeprägte Kalzifizierungsprozesse zu beobachten sind (120;121). Verkalkungstendenzen, die beim Menschen erst nach Jahren auftreten, können insbesondere beim jungen Schaf auf diese Weise schon nach kurzer Implantationszeit nachgewiesen werden (122).

Das Schaf als alleiniges geeignetes präklinisches Tiermodell zu sehen, wird jedoch zunehmend bezweifelt. Klappenimplantationen scheinen durch eine überschießende Fibrosierungsreaktion stärker von fibrotischem Gewebe überwachsen zu werden als dies bei Menschen der Fall wäre (123). Um Fehleinschätzungen bezüglich der Übertragbarkeit auf den Menschen zu vermeiden müssen deshalb Versuche an alternativen Tiermodellen in Erwägung gezogen werden.

4.3.2 Untersuchung der letalen Komplikationen

Durch die Untersuchung der verstorbenen Tiere konnten Erkenntnisse zu der Anwendbarkeit und den Auswirkungen der TE-klappentragenden Stents *in vivo* gewonnen werden.

Bei 67% der verstorbenen Versuchstiere kam es während der Applikation oder zeitnah nach der Implantation zu einer durch den Stent verursachten Perforation. Eine mangelnde Funktionsfähigkeit der eingenähten Pulmonalklappen konnte bei diesen Tieren ausgeschlossen werden. Ein Zusammenhang mit den von uns verwendeten Nitinol-Stents oder mit dem Applikationsvorgang ist somit zu vermuten. Da sich der Applikationsvorgang bereits in vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit guten Ergebnissen bewährt hat (115), scheint in erster Linie der Stent selbst für die aufgetretenen Komplikationen verantwortlich zu sein. Die Erfahrungen und guten Ergebnisse mit selbstexpandierenden Nitinol-Stents in anderen Studien geben darauf jedoch keine Hinweise (80-83). Im Gegensatz zu den von uns verwendeten Stents mit einem Soll-Durchmesser von 26 mm und einer Länge von 44 mm, wurden dort Stents mit Soll-Durchmesser zwischen 22-24 mm und einer Länge von 28mm verwendet. Vor allem die Stentgröße könnte so eine entscheidende Rolle spielen. Da die relativ scharfkantigen Rautenspitzen während der Entfaltung durch den Katheter zirkulär nach außen zeigen (s. Abb. 23, Seite 34), könnten sie in dieser Phase ein Trauma verursacht haben. Je größer der Durchmesser und je länger der Stent ist, desto ausgeprägter ist dieser Effekt.

Neben den möglichen Risiken sind die positiven Effekte größerer Stentdurchmesser zu beachten. Der Soll-Durchmesser von 26 mm wurde in dieser Studie gewählt, um einer Migration vorzubeugen. Trotz sehr guter Ergebnisse in unserer Versuchsreihe bezüglich des Migrationsverhaltens (siehe Dissertationsschrift von Alkje Twellmeier), sollte die Auswahl des Stentdurchmessers bei der Betrachtung von Risiko und Nutzen neu bewertet werden. Die in vorherigen Versuchen aufgetretenen Migrationsprobleme der klappentragenden Stents lagen weniger an dem Soll-Durchmesser von 24 mm als vielmehr an den eingenähten Jugularvenenklappen (115), die die Expansionsfähigkeit verminderten. Der Durchmesser der klappentragenden Stents bei 37°C lag dort im Mittel bei 21,8 mm. Die von uns verwendeten Pulmonalklappen schränkten die Expansionsfähigkeit weniger ein (im Mittel 25,2 mm Durchmesser bei 26 mm Stents; s. 4.2.3). In 24 mm Stents integrierte Pulmonalklappen würden

die Expansionsfähigkeit wahrscheinlich kaum beeinträchtigen. Folglich könnten so auch bei kleineren Soll-Durchmessern gute Migrationsergebnisse bei gleichzeitig verminderten Verletzungsrisiken erwartet werden.

Für eine entsprechende Weiterentwicklung der Stents sollte sowohl der Durchmesser als auch die Länge der Nitinol-Stents reduziert werden. Zusätzlich könnten abgeschliffene Rautenspitzen einer Perforation vorbeugen. In folgenden Versuchsreihen müsste untersucht werden, ob ähnlich gute Migrationsergebnisse mit einer geringeren Rate an Perforationskomplikationen resultieren.

4.4 Einschränkungen der Studie

Einschränkend muss erwähnt werden, dass es sich bei den erfolgten *in vitro*-Untersuchungen der klappentragenden Stents ausschließlich um Kurzzeitmessungen handelte.

Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen von dezellularisierten und besiedelten Klappensegeln dienten eher einer Veranschaulichung als einer Beweisführung. Der hier beschriebene Herstellungsprozess von TE-klappentragenden Stents soll als Durchführungsgrundlage für die folgende Versuchsreihe genutzt werden. Umfangreiche histologische Untersuchungen von *in vitro* besiedelten klappentragenden Stents sollen nachfolgend umgesetzt werden. Eine Etablierung von Zellmarkierungsverfahren ist zusätzlich anzustreben, um differenzierte Aussagen zu den aufgetragenen Zellen liefern zu können.

Eine weitere Limitation dieser Studie stellt das verwendete Applikationssystem dar. Die Kathetergröße von 22 French, an der sich die gesamte Präparation orientierte, erwies sich am Schaf als geeignet. Dieser Durchmesser wäre jedoch für Femoralgefäße des Menschen und besonders von kindlichen Patientinnen zu groß. Auch auf die mechanische Irritation im Herzen würden sich kleinere Applikationskatheter positiv auswirken. Den Durchmesser des Applikationskatheters zu verringern ist somit von großer Wichtigkeit.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Vorgehen und die verwendeten Materialien bewährten sich während der Versuchsreihe. Die klappentragenden Stents zeigten sich nach unseren Einschätzungen funktionstüchtig und suffizient und damit einsetzbar. Die Auswahl der Stentgröße und die Beschaffenheit der Stents sollten in einer Weiterentwicklung modifiziert werden, um Perforationsrisiken zu minimieren. Bei der Betrachtung möglicher Zellquellen für eine *in vitro*-Besiedlung wird die Erschließung alternativer Zelltypen zukünftig an Bedeutung gewinnen, da zugängliche Arterien beim Menschen nur in begrenztem Ausmaß vorhanden sind. Die Verwendung embryonaler

Stammzellen oder adulter Stammzellen aus Nabelschnurblut oder Knochenmark bieten interessante Ansätze.

Ob eine *in vitro*-Besiedlung notwendig bzw. vorteilhaft ist, muss ebenfalls in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Sollte die Besiedlung nicht erforderlich sein, würde das die Herstellung und Anwendung der neuartigen klappentragenden Stents deutlich vereinfachen (5 statt 47 Tage). Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bezüglich *in vitro*-Besiedlung und *in vivo*-Rebesiedlung von Herzklappen sind sehr gegensätzlich und werden kontrovers diskutiert. In Tierversuchen konnten Stock et al., Leyh et al. und Brody et al. eine erfolgreiche *in vivo*-Rebesiedlung von azellulären Trägersubstanzen demonstrieren (39;40;44). Hoerstrup et al., Steinhoff et al., Sodian et al. und Schmidt et al. hingegen konnten in ihren Versuchen den Vorteil der *in vitro*-Besiedlung gegenüber der *in vivo*-Besiedlung aufzeigen (48;92;124). Histologische Auswertungen der dezellularisierten Stents, die im Rahmen dieser Studie für eine *in vivo*-Rebesiedlung implantiert wurden, stehen noch aus.

Eine Pulmonalklappe, die sich perkutan implantieren lässt und zusätzlich Wachstums- und Regenerationspotenzial besitzt, würde neue Therapieoptionen eröffnen. Besonders die (Re)Operationsmöglichkeiten und -indikationen kongenitaler Vitien könnten erweitert werden (86;125). Auch für reine Forschungszwecke und Tierversuchsreihen bietet die Verbindung von Tissue Engineering mit perkutanen Applikationsmethoden neue Möglichkeiten. Andere Arbeitsgruppen die im Bereich Tissue Engineering forschen, müssen für *in vivo*-Versuche bisher aufwendige Operationsmethoden anwenden. Da TE-Herzklappen mit perkutanen Verfahren ohne extrakorporale Zirkulation implantiert werden können, ist eine zügigere Versuchsdurchführung umsetzbar. Dadurch ließen sich *in vivo*-Versuche von TE-Klappen mit höheren Fallzahlen realisieren, was die statistische Aussagekraft der Studien verbessern würde. Unsere Daten zeigen viel versprechende Möglichkeiten für einen neuartigen Herzklappentyp auf. Weitere experimentelle Arbeiten müssen jedoch zeigen, in wie weit sich die Methoden des Tissue Engineerings mit dem perkutanen Pulmonalklappenersatz weiter effektiv vereinen lassen. Bis zu einem möglichen klinischen Einsatz von Tissue engineerter klappentragenden Stents sind vor allem noch ausgedehnte Langzeitversuchsreihen an Großtieren notwendig.

5 Zusammenfassung

In einer Zusammenführung des perkutanen Pulmonalklappenersatzes und des Tissue Engineering könnten sich die jeweiligen Vorteile der beiden Verfahren vereinen. Ziel dieser Arbeit ist es einen Tissue engineerten, klappentragenden Stent auf der Basis eines dezellularisierten Klappengerüsts zu entwickeln, der sich für den perkutanen Einsatz am ovinen Großtiermodell eignet. Zusätzlich wird die Entwicklung, Funktionsfähigkeit und Qualität der gefertigten Stents evaluiert.

Als Grundlage für die Herstellung wurden porcine Pulmonalklappen und oviner Dünndarm präpariert und in einem selbstexpandierenden Nitinol-Stent mit 26 mm Durchmesser fixiert. Diese Konstruktion wurde anschließend mit einer Enzymlyse dezellularisiert, um ein azelluläres Klappengerüst für eine *in vivo*-Rebesiedlung oder eine *in vitro*-Besiedlung mit autologen Zellen zu schaffen. Insgesamt wurden 40 klappentragende Stents hergestellt. Zehn klappentragende Stents wurden als Prototypen für einen Test am Applikationskatheter und weitere sechs für erste für Dezellularisierungs- und Besiedlungsversuche gefertigt. Für *in vitro*-Untersuchungen und den Einsatz am ovinen Großtiermodell wurden 24 klappentragende Stents hergestellt. Mit folgenden Methoden wurden diese 24 Stents auf ihre Eignung untersucht und bewertet: Makroskopische Beurteilung, Suffizienztest mittels NaCl-Lösung und Messung der Expansionsfähigkeit. Drei Stents wurden mikrobiologisch untersucht. Exemplarisch wurde ein Stent einem Funktionstest im Kreislaufmodell unterzogen. Insgesamt wurde 12 Versuchstieren ein klappentragender Stent implantiert. Die Anwendbarkeit und mögliche Akutfolgen der Stent-Applikation *in vivo* wurde durch eine Untersuchung der verstorbenen Versuchstiere betrachtet.

Für erste Präparationsversuche wurden 50 porcine Pulmonalklappen verbraucht. Nach einer erfolgreichen Umsetzung der Präparation und Fixierung von Klappe und Dünndarm konnten 10 klappentragende Stents als Prototypen in einen 22 French Applikationskatheter geladen werden. Die Handhabung des Dezellularisierungsverfahrens mit Trypsin/EDTA stellte sich unproblematisch dar. Die gewählte Dezellularisierungsdauer von 24 h zeigte dabei gute Ergebnisse. Auch die Zellkultivierung konnte erfolgreich umgesetzt werden. Nach 19-20 Tagen wurden genügend vitale Endothelzellen und nach durchschnittlich 22 Tagen genügend vitale glatte Muskelzellen kultiviert. Die Einrichtung eines statischen und dynamischen Besiedlungsvorganges konnte realisiert werden. Ein dezellularisierter klappentragender Stent konnte in 5, ein *in vitro* besiedelter in 47 Tagen hergestellt werden.

Die *in vitro*-Evaluation der 24 Klappenstents zeigte folgende Ergebnisse: Im Suffizienztest konnten die Stents im Mittel eine Flüssigkeitssäule für 117,5 s halten. Die Messung bei 37°C ergab einen mittleren Durchmesser von 25,2 mm. Bei der makroskopischen Beurteilung wiesen sechs Stents kleine Beschädigungen auf. Keiner der untersuchten Stents zeigte eine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen. Der im Kreislaufmodell getestete klappentragende Stent öffnete und schloss sich regelrecht. Die Druckwerte entsprachen der Norm.

Die Untersuchung der verstorbenen Versuchstiere ergab, dass 67% der Gesamtsterblichkeit mit einer akuten, durch den Stent verursachten Perforation assoziiert waren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein Herstellungsprozess selbstexpandierender, porcine Pulmonalklappen tragender Nitinol-Stents mit Methoden des Tissue Engineering etabliert werden. Das Vorgehen und die verwendeten Materialien bewährten sich. Die klappentragenden Stents erwiesen sich nach unseren Einschätzungen als funktionstüchtig und suffizient und damit einsetzbar. Die Größe und Beschaffenheit der Nitinol-Stents sollte modifiziert werden, um Perforationsrisiken während der Applikation weiter zu verringern.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Soler-Soler J, Galve E.: Worldwide perspective of valve disease. *Heart* 2000; 83: 721-725
- 2 Lindroos M, Kupari M, Heikkila J, Tilvis R.: Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1993; 21: 1220-1225
- 3 Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM.: Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; 29: 630-634
- 4 Wilmshurst PT, Stevenson RN, Griffiths H, Lord JR.: A case-control investigation of the relation between hyperlipidaemia and calcific aortic valve stenosis. *Heart* 1997; 78: 475-479
- 5 Michaels AD, Lederman RJ, MacGregor JS, Cheitlin MD.: Cardiovascular involvement in AIDS. *Curr. Probl. Cardiol.* 1997; 22: 109-148
- 6 Khan MA, Herzog CA, St Peter JV, Hartley GG, Madlon-Kay R, Dick CD, Asinger RW, Vessey JT.: The prevalence of cardiac valvular insufficiency assessed by transthoracic echocardiography in obese patients treated with appetite-suppressant drugs. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 713-718
- 7 Redfield MM, Nicholson WJ, Edwards WD, Tajik AJ.: Valve disease associated with ergot alkaloid use: echocardiographic and pathologic correlations. *Ann. Intern. Med.* 1992; 117: 50-52
- 8 Asherson RA, Cervera R.: Antiphospholipid antibodies and the heart. Lessons and pitfalls for the cardiologist. *Circulation* 1991; 84: 920-923
- 9 Boon A, Cheriex E, Lodder J, Kessels F.: Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve. *Heart* 1997; 78: 472-474
- 10 Gohlke-Barwolf C, Gohlke H, Samek L, Peters K, Betz P, Eschenbruch E, Roskamm H.: Exercise tolerance and working capacity after valve replacement. *J. Heart Valve Dis.* 1992; 1: 189-195
- 11 Shipton B, Wahba H.: Valvular heart disease: review and update. *Am. Fam. Physician* 2001; 63: 2201-2208
- 12 Sidhu P, O'Kane H, Ali N, Gladstone DJ, Sarsam MA, Campalani G, MacGowan SW.: Mechanical or bioprosthetic valves in the elderly: a 20-year comparison. *Ann. Thorac. Surg.* 2001; 71: S257-S260
- 13 Carrier M, Pellerin M, Perrault LP, Page P, Hebert Y, Cartier R, Dyrda I, Pelletier LC.: Aortic valve replacement with mechanical and biologic prosthesis in middle-aged patients. *Ann. Thorac. Surg.* 2001; 71: S253-S256

- 14 Harken DE, Soroff HS, Taylor WJ, Lefemine AA, Gupta SK, Lunzer S.: Partial and complete prostheses in aortic insufficiency. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1960; 40: 744-762
- 15 Starr A, Edwards ML.: Mitral replacement: clinical experience with a ball-valve prosthesis. *Ann. Surg.* 1961; 154: 726-740
- 16 Cannegieter SC, Rosendaal FR, Briet E.: Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses. *Circulation* 1994; 89: 635-641
- 17 Sullivan JM, Harken DE, Gorlin R.: Pharmacologic control of thromboembolic complications of cardiac-valve replacement. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 1968; 279: 576-580
- 18 Arom KV, Nicoloff DM, Kersten TE, Northrup WF, III, Lindsay WG, Emery RW.: Ten years' experience with the St. Jude Medical valve prosthesis. *Ann. Thorac. Surg.* 1989; 47: 831-837
- 19 DeWall RA, Qasim N, Carr L.: Evolution of mechanical heart valves. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69: 1612-1621
- 20 Bach DS, Goldbach M, Sakwa MP, Petracek M, Errett L, Mohr F.: Hemodynamics and early performance of the St. Jude Medical Regent aortic valve prosthesis. *J. Heart Valve Dis.* 2001; 10: 436-442
- 21 Masters RG, Helou J, Pipe AL, Keon WJ.: Comparative clinical outcomes with St. Jude Medical, Medtronic Hall and CarboMedics mechanical heart valves. *J. Heart Valve Dis.* 2001; 10: 403-409
- 22 Sezai A, Shiono M, Akiyama K, Orime Y, Hata H, Yagi S, Yamamoto T, Tsukamoto S, Hasegawa M, Negishi N, Sezai Y.: Evaluation of St. Jude Medical valve's long-term function by Doppler echocardiography. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001; 7: 216-222
- 23 Butchart EG, Li HH, Payne N, Buchan K, Grunkemeier GL.: Twenty years' experience with the Medtronic Hall valve. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001; 121: 1090-1100
- 24 Kleine P, Perthel M, Hasenkam JM, Nygaard H, Hansen SB, Laas J.: Downstream turbulence and high intensity transient signals (HITS) following aortic valve replacement with Medtronic Hall or St. Jude Medical valve substitutes. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2000; 17: 20-24
- 25 Hammermeister K, Sethi GK, Henderson WG, Grover FL, Oprian C, Rahimtoola SH.: Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36: 1152-1158
- 26 Ross DN.: Homograft replacement of the aortic valve. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)* 1965; Suppl-94

-
- 27 Yankah AC, exi-Meskhishvili V, Weng Y, Berger F, Lange P, Hetzer R.: Performance of aortic and pulmonary homografts in the right ventricular outflow tract in children. *J. Heart Valve Dis.* 1995; 4: 392-395
 - 28 Binet JP, Carpentier A, Langlois J, Duran C, Colvez P.: [Implantation of heterogenic valves in the treatment of aortic cardiopathies]. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* 1965; 261: 5733-5734
 - 29 Sands MP, Rittenhouse EA, Mohri H, Merendino KA.: An anatomical comparison of human pig, calf, and sheep aortic valves. *Ann. Thorac. Surg.* 1969; 8: 407-414
 - 30 Silberman S, Shaheen J, Merin O, Fink D, Shapira N, Liviatan-Strauss N, Bitran D.: Exercise hemodynamics of aortic prostheses: comparison between stentless bioprostheses and mechanical valves. *Ann. Thorac. Surg.* 2001; 72: 1217-1221
 - 31 Walther T, Falk V, Langebartels G, Kruger M, Bernhardt U, Diegeler A, Gummert J, Autschbach R, Mohr FW.: Prospectively randomized evaluation of stentless versus conventional biological aortic valves: impact on early regression of left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1999; 100: II6-10
 - 32 Williams RJ, Muir DF, Pathi V, MacArthur K, Berg GA.: Randomized controlled trial of stented and stentless aortic bioprostheses: hemodynamic performance at 3 years. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1999; 11: 93-97
 - 33 Santini F, Bertolini P, Montalbano G, Vecchi B, Pessotto R, Prioli A, Mazzucco A.: Hancock versus stentless bioprosthesis for aortic valve replacement in patients older than 75 years. *Ann. Thorac. Surg.* 1998; 66: S99-103
 - 34 Aklog L, Carr-White GS, Birks EJ, Yacoub MH.: Pulmonary autograft versus aortic homograft for aortic valve replacement: interim results from a prospective randomized trial. *J. Heart Valve Dis.* 2000; 9: 176-188
 - 35 Knott-Craig CJ, Elkins RC, Santangelo KL, McCue C, Lane MM.: Aortic valve replacement: comparison of late survival between autografts and homografts. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69: 1327-1332
 - 36 Roberts WC.: Choosing a substitute cardiac valve: type, size, surgeon. *Am. J. Cardiol.* 1976; 38: 633-644
 - 37 Vacanti CA, Vacanti JP.: The science of tissue engineering. *Orthop. Clin. North Am.* 2000; 31: 351-356
 - 38 Vacanti JP.: Tissue and organ engineering: can we build intestine and vital organs? *J. Gastrointest. Surg.* 2003; 7: 831-835
 - 39 Brody S, Pandit A.: Approaches to heart valve tissue engineering scaffold design. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2007; 83: 16-43
 - 40 Stock UA, Schenke-Layland K.: Performance of decellularized xenogeneic tissue in heart valve replacement. *Biomaterials* 2006; 27: 1-2

- 41 Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE, Jr.: Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann. Thorac. Surg.* 1995; 60: S513-S516
- 42 Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, Nollert GD, Herden T, Sperling JS, Moran A, Lien J, Martin DP, Schoen FJ et al.: Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2000; 119: 732-740
- 43 Walluscheck KP, Steinhoff G, Kelm S, Haverich A.: Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 1996; 12: 321-330
- 44 Leyh RG, Wilhelmi M, Rebe P, Fischer S, Kofidis T, Haverich A, Mertsching H.: In vivo repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation. *Ann. Thorac. Surg.* 2003; 75: 1457-1463
- 45 Schenke-Layland K, Opitz F, Gross M, Doring C, Halbhuber KJ, Schirrmeyer F, Wahlers T, Stock UA.: Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an in vitro study. *Cardiovasc. Res.* 2003; 60: 497-509
- 46 Wilson GJ, Courtman DW, Klement P, Lee JM, Yeger H.: Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement. *Ann. Thorac. Surg.* 1995; 60: S353-S358
- 47 Stock UA, Vacanti JP, Mayer Jr JE, Wahlers T.: Tissue engineering of heart valves -- current aspects. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2002; 50: 184-193
- 48 Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pethig K, Haverich A, Bader A.: Tissue Engineering of Pulmonary Heart Valves on Allogenic Acellular Matrix Conduits : In Vivo Restoration of Valve Tissue. *Circulation* 2000; 102: III-50
- 49 Leyh R, Wilhelmi M, Haverich A, Mertsching H.: [A xenogeneic acellularized matrix for heart valve tissue engineering: in vivo study in a sheep model]. *Z. Kardiol.* 2003; 92: 938-946
- 50 Andersen HR, Knudsen LL, Hasenkam JM.: Transluminal implantation of artificial heart valves. Description of a new expandable aortic valve and initial results with implantation by catheter technique in closed chest pigs. *Eur. Heart J.* 1992; 13: 704-708
- 51 Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Saliba Z, Hausse AO, Aggoun Y, Bonnet D, Sidi D, Kachaner J.: Transcatheter implantation of a bovine valve in pulmonary position: a lamb study. *Circulation* 2000; 102: 813-816
- 52 Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Saliba Z, Merckx J, Aggoun Y, Bonnet D, Acar P, Le BJ, Sidi D, Kachaner J.: Percutaneous replacement of pulmonary valve in a right-ventricle to pulmonary-artery prosthetic conduit with valve dysfunction. *Lancet* 2000; 356: 1403-1405

-
- 53 Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Qureshi SA, Le BJ, Iserin L, Acar P, Merckx J, Kachaner J, Sidi D.: Percutaneous insertion of the pulmonary valve. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 39: 1664-1669
 - 54 Boudjemline Y, Bonhoeffer P.: Steps toward percutaneous aortic valve replacement. *Circulation* 2002; 105: 775-778
 - 55 Boudjemline Y, Bonhoeffer P.: Percutaneous implantation of a valve in the descending aorta in lambs. *Eur. Heart J.* 2002; 23: 1045-1049
 - 56 Boudjemline Y, Bonnet D, Sidi D, Bonhoeffer P.: Percutaneous implantation of a biological valve in the aorta to treat aortic valve insufficiency -- a sheep study. *Med. Sci. Monit.* 2002; 8: BR113-BR116
 - 57 Boudjemline Y, Bonhoeffer P.: Percutaneous valve replacement: a fad or an advance? *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2004; 1: 62-63
 - 58 Boudjemline Y, Agnoletti G, Bonnet D, Sidi D, Bonhoeffer P.: Percutaneous pulmonary valve replacement in a large right ventricular outflow tract: an experimental study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 43: 1082-1087
 - 59 Boudjemline Y, Bonhoeffer P.: Images in cardiovascular medicine. Percutaneous aortic valve replacement in animals. *Circulation* 2004; 109: e161
 - 60 Boudjemline Y, Agnoletti G, Bonnet D, Behr L, Borenstein N, Sidi D, Bonhoeffer P.: Steps toward the percutaneous replacement of atrioventricular valves an experimental study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005; 46: 360-365
 - 61 Boudjemline Y, Laborde F, Pineau E, Mollet A, Abadir S, Borenstein N, Behr L, Bonhoeffer P.: Expandable right ventricular-to-pulmonary artery conduit: an animal study. *Pediatr. Res.* 2006; 59: 773-777
 - 62 Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F, Derumeaux G, Anselme F, Laborde F, Leon MB.: Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation* 2002; 106: 3006-3008
 - 63 Lutter G, Kuklinski D, Berg G, von SP, Martin J, Handke M, Uhrmeister P, Beyersdorf F.: Percutaneous aortic valve replacement: an experimental study. I. Studies on implantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2002; 123: 768-776
 - 64 Sochman J, Peregrin JH, Pavcnik D, Timmermans H, Rosch J.: Percutaneous transcatheter aortic disc valve prosthesis implantation: a feasibility study. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 2000; 23: 384-388
 - 65 Pavcnik D, Wright KC, Wallace S.: Development and initial experimental evaluation of a prosthetic aortic valve for transcatheter placement. Work in progress. *Radiology* 1992; 183: 151-154
 - 66 Florath I, Rosendahl UP, Mortasawi A, Bauer SF, Dalladaku F, Ennker IC, Ennker JC.: Current determinants of operative mortality in 1400 patients requiring aortic valve replacement. *Ann. Thorac. Surg.* 2003; 76: 75-83
-

-
- 67 Fish RD.: Percutaneous heart valve replacement: enthusiasm tempered. *Circulation* 2004; 110: 1876-1878
- 68 Cribier A, Eltchaninoff H, Tron C, Bauer F, Agatiello C, Sebah L, Bash A, Nusimovici D, Litzler PY, Bessou JP, Leon MB.: Early experience with percutaneous transcatheter implantation of heart valve prosthesis for the treatment of end-stage inoperable patients with calcific aortic stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 43: 698-703
- 69 Levi DS, Alejos JC, Moore JW.: Future of interventional cardiology in pediatrics. *Curr. Opin. Cardiol.* 2003; 18: 79-90
- 70 Attmann T, Cremer J, Lutter G.: Percutaneous aortic valve replacement: far from ideal. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005; 53: 131-132
- 71 Lutter G, Cremer J.: Percutaneous aortic valve replacement: more than palliation? *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 2004; 2: 1-3
- 72 Quaden R, Attmann T, Boening A, Cremer J, Lutter G.: Percutaneous aortic valve replacement: resection before implantation. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2005; 27: 836-840
- 73 Quaden R, Klaws GR, Theisen-Kunde D, Lutter G.: Percutaneous aortic valve replacement: first endovascular resection of human aortic valves in situ. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2007; 31: 305
- 74 Attmann T, Jahnke T, Quaden R, Boening A, Muller-Hulsbeck S, Cremer J, Lutter G.: Advances in experimental percutaneous pulmonary valve replacement. *Ann. Thorac. Surg.* 2005; 80: 969-975
- 75 Attmann T, Quaden R, Jahnke T, Muller-Hulsbeck S, Boening A, Cremer J, Lutter G.: Percutaneous pulmonary valve replacement: 3-month evaluation of self-expanding valved stents. *Ann. Thorac. Surg.* 2006; 82: 708-713
- 76 Attmann T, Steinseifer U, Cremer J, Lutter G.: Percutaneous valve replacement: a novel low-profile polyurethane valved stent. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2006; 30: 379
- 77 Attmann T, Lutter G, Quaden R, Jahnke T, Rumberg K, Cremer J, Muller-Hulsbeck S.: Percutaneous valve replacement: significance of different delivery systems in vitro and in vivo. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 2006; 29: 406-412
- 78 Attmann T, Quaden R, Freistedt A, Konig C, Cremer J, Lutter G.: Percutaneous heart valve replacement: histology and calcification characteristics of biological valved stents in juvenile sheep. *Cardiovasc. Pathol.* 2007; 16: 165-170
- 79 Duerig TW, Pelton AR, Stockel D.: The utility of superelasticity in medicine. *Biomed. Mater. Eng* 1996; 6: 255-266
- 80 Ferrari M, Figulla HR, Schlosser M, Tenner I, Frerichs I, Damm C, Guyenot V, Werner GS, Hellige G.: Transarterial aortic valve replacement with a self expanding stent in pigs. *Heart* 2004; 90: 1326-1331
-

-
- 81 Figulla HR, Ferrari M.: [Percutaneously implantable aortic valve: the JenaValve concept evolution]. *Herz* 2006; 31: 685-687
 - 82 Zhou JQ, Corno AF, Huber CH, Tozzi P, von Segesser LK.: Self-expandable valved stent of large size: off-bypass implantation in pulmonary position. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2003; 24: 212-216
 - 83 von Segesser LK.: Direct percutaneous valve replacement: the next step? *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2004; 26: 873-874
 - 84 Boudjemline Y, Khambadkone S, Bonnet D, Derrick G, Agnoletti G, Deanfield J, Sidi D, Bonhoeffer P.: Percutaneous Replacement of the Pulmonary Valve in a 12-Year-Old Child. *Circulation* 2004; 110: e516
 - 85 Khambadkone S, Coats L, Taylor A, Boudjemline Y, Derrick G, Tsang V, Cooper J, Muthurangu V, Hegde SR, Razavi RS et al.: Percutaneous pulmonary valve implantation in humans: results in 59 consecutive patients. *Circulation* 2005; 112: 1189-1197
 - 86 Khambadkone S, Bonhoeffer P.: Percutaneous pulmonary valve implantation. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg. Pediatr. Card Surg. Annu.* 2006; 23-28
 - 87 Khambadkone S, Nordmeyer J, Bonhoeffer P.: Percutaneous implantation of the pulmonary and aortic valves: indications and limitations. *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown.)* 2007; 8: 57-61
 - 88 Stoeckel D, Pelton A, Duerig T.: Self-expanding nitinol stents: material and design considerations. *Eur. Radiol.* 2004; 14: 292-301
 - 89 Duerig T, Wholey M.: A comparison of balloon- and self-expanding stents. *Min. Invas. Ther. Allied Technol.* 2002; 11: 173-178
 - 90 Stock UA, Degenkolbe I, Attmann T, Schenke-Layland K, Freitag S, Lutter G.: Prevention of device-related tissue damage during percutaneous deployment of tissue-engineered heart valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2006; 131: 1323-1330
 - 91 Skalak R, Fox C.: Tissue Engineering. In: Skalak R, Fox C, Herausgeber. *Workshop on Tissue Engineering*; 1988 26. -29. 02. 1988; Granlibakken, Lake Tahoe, CA, USA: 1988
 - 92 Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S et al.: Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation* 2000; 102: III44-III49
 - 93 Cheresh DA, Berliner SA, Vicente V, Ruggeri ZM.: Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* 1989; 58: 945-953
 - 94 Joshi P, Chung CY, Aukhil I, Erickson HP.: Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin. *J. Cell Sci.* 1993; 106 (Pt 1): 389-400
-

-
- 95 Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC.: Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2005; 27: 566-571
 - 96 Robicsek F.: Leonardo da Vinci and the sinuses of Valsalva. *Ann. Thorac. Surg.* 1991; 52: 328-335
 - 97 Ichikawa Y, Noishiki Y, Soma T, Ishii M, Yamamoto K, Takahashi K, Mo M, Kosuge T, Kondo J, Matsumoto A.: A new antithrombogenic RV-PA valved conduit. *ASAIO J.* 1994; 40: M714-M718
 - 98 Meezan E, Hjelle JT, Brendel K.: A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life Sci.* 1975; 17: 1721-1732
 - 99 Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, Carabasi RA, Dimuzio PJ.: Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J. Vasc. Surg.* 2004; 40: 146-153
 - 100 Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Batrinac A, Kleczka C, Ciubotaru A, Haverich A.: Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation* 2002; 106: I63-I68
 - 101 Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, Konig K, Riemann I, Halbhuber KJ, Wahlers T, Stock UA.: Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J. Struct. Biol.* 2003; 143: 201-208
 - 102 Stamm C, Steinhoff G.: [Cardiac tissue engineering]. *Herz* 2002; 27: 445-452
 - 103 Sodian R, Lueders C, Kraemer L, Kuebler W, Shakibaei M, Reichart B, Daebritz S, Hetzer R.: Tissue engineering of autologous human heart valves using cryopreserved vascular umbilical cord cells. *Ann. Thorac. Surg.* 2006; 81: 2207-2216
 - 104 Rezai N, Podor TJ, McManus BM.: Bone marrow cells in the repair and modulation of heart and blood vessels: emerging opportunities in native and engineered tissue and biomechanical materials. *Artif. Organs* 2004; 28: 142-151
 - 105 Stock UA, Mayer JE, Jr.: Valves in development for autogenous tissue valve replacement. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg. Pediatr. Card Surg. Annu.* 1999; 2: 51-64
 - 106 Wu X, Rabkin-Aikawa E, Guleserian KJ, Perry TE, Masuda Y, Sutherland FW, Schoen FJ, Mayer JE, Jr., Bischoff J.: Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 2004; 287: H480-H487
 - 107 Tiwari A, Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM.: Tissue engineering of vascular bypass grafts: role of endothelial cell extraction. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2001; 21: 193-201
-

-
- 108 Pätzold E.: Adaptation von statisch kultivierten Endothelzellen auf PU-Prothesen an Scherkräfte in vitro. Med. Diss. 2008, München
 - 109 Bourke BM, Roche WR, Appleberg M.: Endothelial cell harvest for seeding vascular prostheses: the influence of technique on cell function, viability, and number. *J. Vasc. Surg.* 1986; 4: 257-263
 - 110 Teebken OE, Pichlmaier AM, Haverich A.: Cell seeded decellularised allogeneic matrix grafts and biodegradable polydioxanone-prostheses compared with arterial autografts in a porcine model. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2001; 22: 139-145
 - 111 Zund G, Pretre R, Niederhauser U, Vogt PR, Turina MI.: Improved exposure of the pulmonary arteries for thromboendarterectomy. *Ann. Thorac. Surg.* 1998; 66: 1821-1823
 - 112 Minuth WW, Schumacher K, Strehl R, Kloth S.: Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed* 2000; 11: 495-522
 - 113 Nerem RM, Seliktar D.: Vascular tissue engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng* 2001; 3: 225-243
 - 114 Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP, Mayer JE, Jr.: New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves. *Tissue Eng* 2000; 6: 75-79
 - 115 Bohlen A.: Perkutaner Pulmonalklappenersatz: Herstellung selbstexpandierender bovine Jugularvenenklappentragender Stents und deren Evaluation in-vitro und in-vivo. Med. Diss. 2008, Kiel
 - 116 Khambadkone S, Bonhoeffer P.: Percutaneous implantation of pulmonary valves. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 2003; 1: 541-548
 - 117 Steiner M.: Beurteilung von biologischen und mechanischen Herzklappenprothesen anhand zeitaufgelöster Verfahren. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, 2005, Kiel
 - 118 Schenke-Layland K, Madershahian N, Riemann I, Starcher B, Halbhuber KJ, König K, Stock UA.: Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets. *Ann. Thorac. Surg.* 2006; 81: 918-926
 - 119 Ali ML, Kumar SP, Bjornstad K, Duran CM.: The sheep as an animal model for heart valve research. *Cardiovasc. Surg.* 1996; 4: 543-549
 - 120 Gallo I, Nistal F, Fernandez D, Factor SM, Frater RW.: Comparative study of calcification in the T6-treated and standard Hancock-I porcine xenografts: experimental study in weanling sheep. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1986; 34: 310-315
 - 121 Palma A, Hoffman DM, Nanna M, Fernandes S, Sisto DA.: Transesophageal echocardiography for the evaluation of mitral valve prostheses in the weanling sheep. *ASAIO Trans.* 1991; 37: M169-M170
-

- 122 Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, Black KS, O'brien MF.: Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 70: 1962-1969
- 123 Vesely I.: Heart valve tissue engineering. *Circ. Res.* 2005; 97: 743-755
- 124 Schmidt D, Mol A, Kelm JM, Hoerstrup SP.: In vitro heart valve tissue engineering. *Methods Mol. Med.* 2007; 140: 319-330
- 125 Steinhoff G.: [The regenerating heart -- hope for children with congenital heart defects]. *Kinderkrankenschwester.* 2006; 25: 47-50

7 Danksagungen

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

Für die Bereitstellung des Themas und die stets freundliche und hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich besonders bei PD Dr. med. Georg Lutter bedanken. Ich danke auch PD Dr. Ulrich Stock und Ilka Degenkolbe für die effektive Kooperation.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Tim Attmann, der mir mit seiner überaus kompetenten Betreuung immer erreichbar zur Seite stand. Seine Unterstützung, die guten Gespräche und nicht zuletzt seine Gastfreundschaft habe ich sehr geschätzt.

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

Herrn Professor G. Pfister und besonders Herrn Dr. rer. nat. Martin Steiner danke ich für die Nutzung des Strömungsmodells und die freundliche Unterstützung.

Frau Alkje Twellmeier und Herrn Florian Ambrust danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Tierversuchen.

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

Zu guter Letzt danke ich Birgit für ihre wertvollen Anregungen und ihre liebevolle Unterstützung. Danke, Du bist meine Inspiration.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname Johannes Bethge
Anschrift Schlieffenallee 6, 24105 Kiel
0431 / 592 77 39
Geburtstag, -ort 13.01.1979, Hamm, Westfalen
Familienstand ledig



Ausbildung

- aktuell seit 03/2006 Promotion an der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie, CAU Kiel (seit 03/2008 Promotionsstudent)
Thema: „*Perkutaner Pulmonalklappenersatz und Tissue Engineering: Die Herstellung und Charakterisierung selbstexpandierender klappentragender Stents auf der Basis eines dezellularisierten Klappengerüsts*“, Betreuer PD. Dr. G. Lutter
- 10/2004 – 03/2008 Studium der Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
▪ 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 11/2007
- 10/2001 – 10/2004 Studium der Medizin an der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg
▪ Erstes Staatsexamen 10/2004
▪ Physikum 10/2003
- 08/1999 – 08/2001 Ausbildung zum Verlagskaufmann bei der Bertelsmann AG in Gütersloh
▪ Dreimonatiger Einsatz bei der Werbeagentur Lowe Worldwide in London über ein Stipendium der Carl Duisburg Gesellschaft
▪ Viermonatiger Einsatz bei Gruner & Jahr in Hamburg
- 08/1998 – 07/1999 Zivildienst beim Arbeiter-Samariter Bund in Hamm, Westfalen
- 08/1989 – 06/1998 Märkisches Gymnasium Hamm, Westfalen, Abschluss Abitur

Praktisches Jahr und Famulaturen

- 08/2006 – 08/2007 Praktisches Jahr an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
▪ Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster, Innere Medizin (Aufnahmestation, Intensivstation, Pulmonologie)
▪ Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel, Chirurgie (Unfallchirurgie, Allgemein Chirurgie, Herzchirurgie)
▪ Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel, Orthopädie

02/2006 Fünfwöchige Famulatur an der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie,
Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel

09/2005 Dreiwöchige Famulatur am Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel,
Klinik für Diagnostische Radiologie

07/2005 Vierwöchige Famulatur am Deutschen Herzzentrum Berlin, Abteilung Angeborene
Herzfehler/Kinderkardiologie

02/2005 Vierwöchige Famulatur am Städtischen Krankenhaus Kiel, Abteilung für Chirurgie

02/2004 Fünfwöchige Famulatur am Evangelischen Krankenhaus in Hamm, Abteilung für
Innere Medizin (Kardiologie, Onkologie, Gastroenterologie)

Arbeit

aktuell seit 07/2005 Studentische Hilfskraft an der Klinik für Gynäkologie UK S-H, Campus Kiel,
Abteilung für Reproduktionsmedizin (Doktoranden Betreuung, Anlegen von
Literaturdatenbanken, Literaturrecherchen, Homepagegestaltung)

11/2003 – 10/2004 Studentische Hilfskraft an den Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannstrost
in Halle, Intensivstation

10/2002 – 10/2003 Studentische Hilfskraft an dem Universitätsklinikum Halle-Wittenberg, Abteilung für
Neurochirurgie (Intensivstation), Klinik für Orthopädie, Klinik für Innere Medizin

08/2002 Zweimonatige Tätigkeit als Verlagskaufmann bei Gruner & Jahr in Hamburg,
Anzeigenmarketing GEO und Stern Magazin