

---

Aus der Abteilung für Kinderkardiologie und pädiatrische Intensivmedizin  
des von Hauserschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München

Leiter: Prof. Dr. med. Prof. Dr. h.c. H. Netz

**Evaluierung einer neuen Hybrid-Technik  
zum Verschluss muskulärer Ventrikelseptumdefekte  
im chronischen Tiermodell**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München  
vorgelegt von

Anja Lehner

aus Pegnitz bei Bayreuth

2011

---

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:

Priv. Doz. Dr. med. R. Kozlik-Feldmann

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Priv. Doz. Dr. med. Andres Beiras-Fernandez

Prof. Dr. med. Georg Nollert

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Nora Lang

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

24.11.2011

---



---

## Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Definition, Prävalenz und Ätiologie der Ventrikelseptumdefekte	8
1.2 Pathophysiologie und Bedeutung in der Klinik	10
1.3 Bisherige Therapiemöglichkeiten der VSDs und ihre Grenzen	13
1.3.1 Chirurgische Therapiemöglichkeiten	13
1.3.2 Interventionelle Therapiemöglichkeiten	15
1.3.3 Die Hybridtherapie	20
1.4 Biokompatibilität bisheriger VSD-Verschlussysteme	24
1.4.1 Die Bedeutung der histologischen Untersuchung explantierter Systeme	24
1.4.2 Verträglichkeit des „Nitinols“ als Grundbaustein perkutaner Implantate	25
1.5 Ziele dieser Arbeit	26
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1 Versuchstiere	27
2.2 VSD-Modell	28
2.3 Verschluss technik	28
2.4 Studiendesign	30
2.5 Versuchsdurchführung	31
2.5.1 Anästhesie	31
2.5.2 Erste Intervention (VSD und VSD-Verschluss)	32
2.5.3 Zweite Intervention (Nachuntersuchung)	38
2.5.4 Dritte Intervention (Abschlussuntersuchung)	39
2.6 Untersuchte Parameter	39
2.6.1 Echokardiographie	39
2.6.2 Magnetresonanztomographie	40
2.6.3 Hämodynamik	40
2.6.4 Histologische Aufarbeitung	41
2.6.5 Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie	42
2.7 Statistische Auswertung	45
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1 VSD-Modell	46
3.2 Patchverschluss des mVSDs	46
3.3 Follow-up	48
3.4 Echokardiographische Parameter	48
3.5 Magnetresonanztomographie	50

---

---

3.6 Hämodynamische Parameter	51
3.6.1 Mittlerer arterieller Druck, systemischer und diastolischer Blutdruck im Versuchsverlauf	51
3.6.2 Pulmonal-arterieller Druck und pulmonal-kapillärer Verschlussdruck	52
3.6.3 Druckverhältnisse im follow-up	52
3.7 Histopathologische Aufarbeitung	53
3.7.1 Makroskopische Evaluation	53
3.7.2 Histopathologie	55
3.7.3 Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie	58
<b>4. Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1 VSD-Modell	60
4.2 VSD-Verschluss in Hybridtechnik	61
4.2.1 Hybrid-Zugang und bisher verwendete Verschlussysteme	61
4.2.2 Bildgebung in der Hybridtherapie	64
4.3 Evaluierung des Verschlussystems im follow-up	66
4.3.1. Echokardiographie, Stressechokardiographie und MRT-Untersuchung	66
4.3.2 Hämodynamik	68
4.4. Untersuchungen zur Biokompatibilität des neuartigen Patchsystems	69
4.4.1 Beurteilung der Verträglichkeit des Nitinols	69
4.4.2 Histopathologische Aufarbeitung der Explantate	70
4.5 Limitationen des neuartigen Verschlussystems	72
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>74</b>
<b>6. Abstract</b>	<b>77</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>10. Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>106</b>
<b>11. Danksagung</b>	<b>107</b>
<b>12. Lebenslauf</b>	<b>108</b>

---

---

## Abkürzungsverzeichnis

AI	Aorteninsuffizienz
ADO	Amplatzer duct occluder
AK	Aortenklappe
ASD	Vorhofseptumdefekt (Atrioseptaler Defekt)
ASO	Amplatzer septal occluder
ASS	Acetylsalicylsäure
AVSDO	Amplatzer VSD occluder
AU	Abschlussuntersuchung
BGA	Blutgasanalyse
cAVB	Kompletter AV-Block
EMAH	Erwachsene mit angeborenen Herzfehlern
FS	Fractional-Shortening
HAES	Hydroxyäthylstärke
HLM	Herzlungenmaschine
HT	Herzton
ICR	Interkostalraum
LA	Linker Vorhof (linkes Atrium)
LV	Linker Ventrikel
LRS	Links-Rechts-Shunt
LSB	Linksschenkelblock
MRT	Magnetresonanztomographie
mVSD	muskulärer Ventrikelseptumdefekt
MVSDO	muscular VSD occluder
NaCl	Natriumchlorid
NU	Nachuntersuchung
p.a	posterior nach anterior
PAP	Pulmonal-arterieller Druck
PCWP	Pulmonal-kapillärer Verschlussdruck (Wedge-Druck)
PDA	persistierender Ductus Arteriosus
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
p.m.	punctum maximum
pmVSD	perimembranöser Ventrikelseptumdefekt
PS	Pulmonalstenose
P II	Pulmonalklappenschlusston
Qp	Lungenblutfluss
Qs	Systemblutfluss

---

SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SSFP	Steady-State-Free-Precession
RT3DE	Real-Time-3D-Echokardiographie
RV	Rechter Ventrikel
RVP	Rechtsventrikulärer Druck
RVSD	Residueller Ventrikelseptumdefekt
TEE	Transösophageale Echokardiographie
TI	Trikuspidalklappeninsuffizienz
TK	Trikuspidalklappe
VAC	Video-assistierte Cardioskopie
VSD	Ventrikelseptumdefekt
ZVD	Zentralvenöser Druck

# 1. Einleitung

## 1.1 Definition, Prävalenz und Ätiologie der Ventrikelseptumdefekte

Im Jahre 1847 beschrieb der Augenarzt John Dalrymple in „A Diseased Heart in which the root of the Aorta had an opening common to the two ventricles“ (Dalrymple 1847) erstmals den anatomischen Befund eines Ventrikelseptumdefektes (VSD). Zwanzig Jahre später leistete Karl Freiherr von Rokitansky mit seinem Werk „Die Defekte der Scheidewände des Herzens“ einen weiteren wichtigen Beitrag zum anatomischen und klinischen Verständnis der Septumdefekte (Rokitansky 1875) und bereits vier Jahre später gelang es H. Roger rein klinisch eine „communication between the two ventricular cavities“ (Roger 1879) zu diagnostizieren, der unkomplizierte, isolierte Ventrikelseptumdefekt, der bis heute den Beinamen „Maladie de Roger“ trägt.

Isolierte VSDs stellen mit einem Anteil von 20-30% die häufigsten aller angeborenen Herzfehlbildungen dar (Hein 2005, Moons 2009), wobei Frühgeborene etwa doppelt so häufig betroffen sind wie ihre termingeborenen Mitstreiter (Moe 1987). Durch die stetige Weiterentwicklung der pränatalen Diagnostik ist in den letzten Jahren eine zunehmende Zahl an VSDs zu erkennen. Gleichzeitig steigt aber auch die Inzidenz der verzeichneten Spontanverschlüsse (Ramaciotti 1995, Roguin 1995). Insgesamt gesehen findet sich bei 50% aller Fälle mit komplexen Herzfehlbildungen, wie etwa einer Transposition der großen Arterien, einer Pulmonalatresie oder einer Aortenisthmusstenose ein zusätzlicher VSD (Minette 2006). Nicht selten ist der VSD dabei ein wichtiger Garant für eine physiologische, und damit lebensrettende Hämodynamik (Rao 1983).

Solch komplexe Fehlbildungen stehen häufig im Zusammenhang mit den unterschiedlichsten Chromosomenanomalien oder Dysmorphie-Syndromen wie dem DiGeorge-Syndrom (del. 22q11.2, 10-15% mit VSD) (McElhinney 2003), die mit einer erhöhten familiären Vererbungswahrscheinlichkeit verbunden sind (Stoll 1989). Isolierte VSDs werden bei betroffenem väterlichem Elternteil mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 2% weitervererbt; ist mütterlicherseits ein VSD aufgetreten, kann mit etwa 6-10% Wiederholungsrisiko gerechnet werden (Nora 1991). Die molekulargenetischen Grundlagen der Entstehung kardialer Fehlbildungen, insbesondere auch der Grundlagen der VSD-Entwicklung werden in den letzten Jahren zunehmend besser verstanden. Es wurde bisher eine Vielzahl an veränderten Genabschnitten und Transkriptionsfaktoren gefunden, die mit der Entstehung eines VSDs in Verbindung gebracht werden (Wang 2009, Reamon-Buettner 2009, Rajagopal 2007, Schott 1998) und auf zukünftige Verbesserungen in Diagnostik und entsprechend zielgerichteter Therapie hoffen lassen. Bei allen Untersuchungen zur Ätiologie der VSDs sollte aber die multifaktorielle Genese nicht vergessen werden, die auch sozio-kulturelle, Umwelt- und sogenannte „Life-Style“-Faktoren mit einbezieht (Roguin 1995). In einer finnischen Studie konnte so ein signifikant erhöhtes Auftreten von VSDs bei Säuglingen festgestellt werden, deren Mütter entweder moderaten Alkoholkonsum im ersten Trimenon angaben, oder auch respiratorische Infekte, Bluthochdruck oder Chemikalienexposition am Arbeitsplatz. Rauchen, Kaffee, Cola, Diazepam, ASS, Anästhesie-Gase, Desinfektionsmittel und auch Pestizide schienen die VSD-Entstehung dagegen nicht zu fördern (Tikkanen 1991, Batra 2007).



Auch Untersuchungen zu eventueller Noxenexposition in der Landwirtschaft ergaben kein erhöhtes Risiko für Mütter aus ländlichen Gebieten (Batra 2007). Durch die Wirkung der verschiedensten externen und internen Einflussfaktoren wird die Kardiomyozytenproliferation zum Stadium der Septumbildung entschieden beeinträchtigt (Contreras-Ramos 2009, Qi 2007). Viele Autoren beschreiben die Entstehung des muskulären Ventrikelseptums als eine passive Aneinanderlagerung der wachsenden primitiven Ventrikelhöhlen (Sadler 2003, Oh`Rahilly 2001). Einer neueren europäischen Studie ist es dagegen gelungen ein „multi-step-model“ der Septumbildung nachzuweisen. Nach passiver Abgrenzung des apikalen Teils des muskulären Ventrikelseptums folgt ein aktives Einwachsen von Kardiomyozyten aus den rechten und linken Ventrikelanteilen. In einem dritten Schritt kommt es zum weiteren abschließenden Wachstum aus den dorsolateralen Septumanteilen selbst (Franco 2006). Der membranöse Teil des Septum interventrikulare wird etwas später im Zusammenhang mit der Unterteilung der Conus-Truncus-Region gebildet (Sadler 2003). Je nach Zeitpunkt der Myozytenproliferationshemmung während der Ventrikeltrennung entstehen so die unterschiedlichen morphologischen Ausprägungen der Scheidewanddefekte.

Bezüglich der Nomenklatur der verschiedenen Defektformen gibt es bisher keine einheitlichen Richtlinien (Anderson 1992). Eine neuere Studie aus den USA hat versucht die gängigsten und in der Klinik verwendeten Schemata (nach Anderson und van Praagh) in einer übersichtlichen Kategorisierung zusammenzufassen (Jacobs 2000). Allen gemein ist jedoch die vor allem therapeutisch relevante Unterteilung in Defekte des membranösen und Defekte des muskulären Teils des Ventrikelseptums (Soto 1980, Anderson 1984, Van Praagh 1989, Anderson 1992). Dabei wird ein muskulärer Defekt als komplett von Muskelgewebe umrandet definiert und kann nach der Arbeitsgruppe von Anderson et al. im Inlet- (posterioren), Trabekulär-, oder Outlet- (Infundibulum-) Bereich des Septums liegen (Jacobs 2000, Minette 2006, Minette 2007). Da der trabekuläre Anteil die grösste Fläche (von membranösem Septum bis zur Herzspitze) des Septum interventrikulare einnimmt, werden Defekte hier nochmals in anterior, midmuskulär und apikal eingeteilt (Jacobs 2000).

Diese gängigsten Schemata wären demnach a) die Einteilung nach Anderson, die vier verschiedene Typen von VSDs unterscheidet: Perimembranös (ein Teil des Randes besteht aus der fibrösen Kontinuität zwischen Trikuspidal- und Aortenklappe), pmVSDs, muskulär (komplett muskulär begrenzt), mVSDs, doubly-committed, supracristal oder juxtaarteriell (die fibröse Kontinuität zwischen Pulmonal- und Aortenklappe formt das Dach des Defektes) und als viertes Defekte, die mit einem „Malalignment“ des Outlet-Septums assoziiert sind. Innerhalb der verschiedenen Typen erfolgt eine weitere Kategorisierung in Inlet-, Trabekulär-, oder Outlet (Synonym: Infundibulär) (Abb. 1). Van Praagh et al. b) orientieren sich an der Embryologie und unterteilen das interventrikuläre Septum in 4 Abschnitte: AV-Kanal-, muskulärer, Septal-Band-, und Conusseptumbereich. Ein Defekt kann in allen Teilen, sowie in ihren Übergangsbereichen auftreten (Abb. 2).

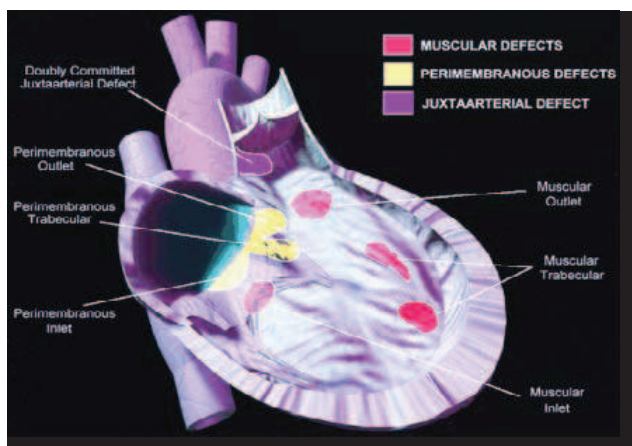


Abb. 1: Einteilung der VSDs nach Anderson (aus Jacobs 2000)

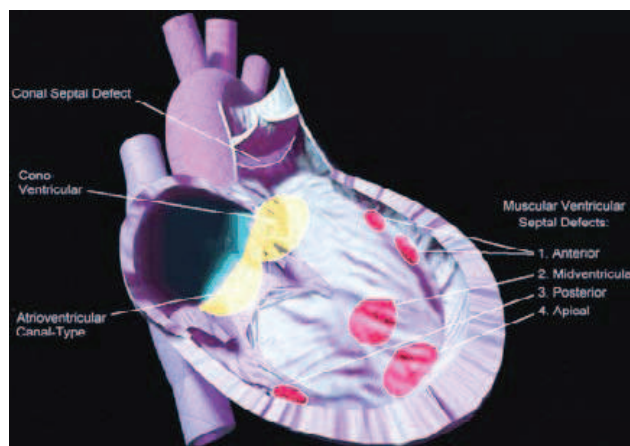


Abb. 2: Einteilung der VSDs nach Van Praagh (aus Jacobs 2000)

## 1.2 Pathophysiologie und Bedeutung in der Klinik

Abhängig von ihrer Lage und ihrer Größe verschliessen sich 25-50% der VSDs vor allem in den ersten drei Lebensjahren spontan, muskuläre mit einer größeren Wahrscheinlichkeit als perimembranöse, 10% sogar noch im Erwachsenenalter (Bloomfield 1964, Shirali 1995, Roguin 1995). Mit zunehmendem Durchmesser und sinkendem Widerstandsverhältnissen im Lungenkreislauf steigt auch das Shuntvolumen über den Defekt. Übersteigt der Lungenblutfluss ( $Q_p$ ) den Körperblutfluss ( $Q_s$ ) um das 1,5-fache (Shuntvolumen  $> 30\%$ ) wird der Links-Rechts-Shunt (LRS) zunehmend hämodynamisch wirksam: Es resultiert eine Volumenbelastung des linken Vorhofs (LA) und des linken Ventrikels (LV). Weiter steigende Shuntvolumina ( $Q_p:Q_s = > 2:1$ ) führen schließlich zu einer zusätzlichen Druckbelastung des rechten Ventrikels (RV) und des Pulmonalkreislaufes bis hin zur Shunt-Umkehr und dem Eisenmenger-Syndrom als die fortgeschrittenste Form des pulmonal-arteriellen Hypertonus (Gall 1961, Park 2007, Schuhmacher 2008, Beghetti 2009).

Abhängig von der Größe des Defektes, dem Shuntvolumen und dem pulmonalen Widerstand (Minette 2006) entwickeln Patienten mit VSD eine progrediente Herzinsuffizienz, zeigen Zeichen von Wachstums- und Entwicklungsverzögerungen, Blässe, Kurzatmigkeit, Arrhythmien, Aortenklappeninsuffizienz (AI) und infektiöse Endokarditiden (Hein 2005). Um ein Eisenmenger Syndrom zu vermeiden, sind größere Defekte bereits im Säuglingsalter therapiebedürftig, da bereits nach 12 Monaten mit pulmonalem Hochdruck irreversible Schäden an den Lungengefäßen auftreten (Kuribayashi 1994).

Bei der klinischen Untersuchung kann palpatorisch bei kleinen und mittelgroßen Defekten ein systolisches Schwirren über dem 4. Intercostalraum (ICR) parasternal erfasst werden. Bei großen Defekten und nahezu angeglichenen intrakardialen Druckverhältnissen fehlt dieses Phänomen. Stattdessen tritt ein nach links verlagertes Herzspitzenstoß mit Pulsus celer et parvus, bei ausgeprägter AI ein Pulsus celer et altus, in den Vordergrund. Auskultatorisch präsentieren die Patienten bei kleinen Defekten unauffällige Herztöne (HT). Mit zunehmender

Größe findet sich ein akzentuierter I. HT über der Herzspitze und ein atemvariabel weit gespaltener II. HT mit betontem Pulmonalklappenschlusston (P II) und ein IV. HT (Vorhoftön) im 3.-4. (ICR) links. Dagegen zeigen bereits kleine Defekte auffällige Herzgeräusche im Sinne eines hochfrequenten 2-5/6 Proto- bis Mesosystolikums mit punctum maximum (p.m.) im 3.-4. ICR links parasternal. Bei größeren VSDs geht dieses in ein lautes, hochfrequentes Holosystolikum über, wird bei sehr großen Defekten und pulmonalem Hochdruck wieder leiser und wandelt sich in ein weiches frühdiastolisches Decrescendo mit p.m. im 2.-3. ICR links parasternal (Pulmonalisinsuffizienz- bzw. Graham-Steel-Geräusch) um. Ein leiser werdendes Systolikum mit zunehmender Betonung des PII stellt bereits ein Alarmzeichen mit Hinweis auf das drohende Eisenmenger-Syndrom dar (Schuhmacher 2008). Elektrokardiographisch findet sich ein Steil- bis Linkslagetyp mit P-sinistocardiale; mit zunehmender RV-Belastung auch ein Rechtslagetyp. Entsprechend der Größe des VSDs und finden sich Zeichen der linksventrikulären, biventrikulären oder auch rein rechtsventrikulären Hypertrophie. Bei großen VSDs kommt es zunehmend zu Erregungsrückbildungsstörungen vor allem in den rechtsseitigen Ableitungen mit ST-Senkungen, T-Abflachung und T-Inversionen (Park 2007, Schuhmacher 2008).

In der konventionellen posterior nach anterior (p.a.) Röntgenaufnahme zeigen Herzen mit kleinen VSDs einen Normalbefund. Erst mit steigendem Shuntvolumen wird der Herzschatten deutlich breiter und nach links verlagert, wobei die Herzspitze als Zeichen der Linksherzdilatation in den Zwerchfellschatten taucht. Während der Truncus pulmonalis prominent erscheint und der vergrößerte LA die Trachealbifurkation auseinander drängt, stellt sich die Aorta eher verschmälert dar. Im seitlichen Strahlengang findet sich eine Einengung des Retrokardialraumes bei vergrößerten und nach dorsal verlagerten LA und LV. Ein Anstieg des Widerstandes im Lungenkreislauf resultiert in einer zunehmenden Rarefizierung der Pulmonalgefäße zur Peripherie hin. Bei fixiertem pulmonalem Hypertonus schließlich, dominiert die RV-Hypertrophie mit angehobener Herzspitze, nur noch gering vergrößertem LA und LV und sehr schmalem Aortenschatten. Das Pulmonalissegment bleibt dagegen weiterhin prominent mit deutlichem Kalibersprung zu den peripheren Gefäßen.

In der Diagnostik der VSDs hat sich in den letzten vier Jahrzehnten die Echokardiographie zur Methode der Wahl entwickelt. Als nicht-invasive Möglichkeit Morphologie, Fehlbildungen und die hämodynamischen Effekte des Defektes äußerst genau darzustellen hat sie sich neben anderen bildgebenden Verfahren als kosten- und zeiteffektivste Methode etabliert (Kleijn 2009). Auch aus Interventions- und Operationsplanung ist die vorherige Ultraschalluntersuchung nicht mehr wegzudenken (Hoch 2002, Minette 2006). In den letzten Jahren konnten durch die fortwährende technischen Verbesserung der 3D- und besonders der Real-Time-3D-Echokardiographie (RT3DE) die bisherigen Limitationen immer weiter eingegrenzt und die präinterventionelle Evaluierung noch weiter optimiert werden (Naqvi 2004). So können durch die 3D-Aufsicht in Echtzeit die anatomischen Begrenzungen der Septumdefekte und anliegende Strukturen sehr genau bestimmt werden, die Shuntgröße gut quantifiziert und sogar die früher sehr schwer einzusehenden apikal-muskulären Ventrikelseptumdefekte wie unter chirurgischer Direktaufsicht („en face view“) dargestellt werden (Helmcke 1989, Kardon 1998, Hoch 2002, van den Bosch 2006). Die verbesserte räumliche Auflösung der 3D-Geräte macht mittlerweile auch den Einsatz bei sehr kleinen Herzen mit schneller Herzfrequenz möglich (van den Bosch 2006). Mit den Echtzeit- Aufnahmen der transösophagealen Real-Time-Geräte können die operative und vor allem auch die perkutane Implantation der Verschlussysteme live begleitet und das Endergebnis sofort bezüglich Lageverhältnissen, Hämodynamik und eventueller Restshunts evaluiert werden (Suematsu 2005, Vasilyev 2006, Hisagi 2009, Lodato 2009, Perk 2009).

Neben den verschiedensten Echokardiographiemethoden stellt die Magnetresonanztomographie (MRT) eine zusätzliche ebenfalls nicht-invasive und sehr sensitive (90% Sensitivität, Wang 2003) Untersuchungsmethode in der VSD-Diagnostik dar. Gerade bei anatomisch komplizierten Fehlbildungen, wie etwa den supracristalen Defekten lassen sich hier therapeutisch wichtige Fragestellungen beantworten. Auch in der Beurteilung des Schweregrades eines Shunts und damit in der Indikationsstellung aller weiteren Therapiemöglichkeiten haben MRT-Untersuchungsergebnisse einen hohen Stellenwert (Wang 2003). Zudem bietet sich das MRT bezüglich der exakten Quantifizierung der Ventrikelvolumina, der Myokardmasse und daraus folgender Funktionsdiagnostik als strahlenarme Alternative zur Herzkatheteruntersuchung an (Kleijn 2009). Die neueste Generation schneller Gradienten-Sequenzen, die segmentierten Steady-state-freeprecession- Sequenzen (SSFP-Sequenzen) zur Erfassung des gesamten Herzzyklus, gewinnen in der VSD-Diagnostik zunehmend an Bedeutung (Hunold 2007).

Die definitive Therapie des VSDs orientiert sich im Wesentlichen an der Symptomatik des Patienten und der Größe des diagnostizierten LRS. Patienten mit kleineren, unkomplizierten Defekten mit einem Shuntvolumen von < 30% werden lediglich routinemäßig nachuntersucht. Ein chirurgischer Verschluss wird derzeit bei großen Defekten (LRS > 50%) bereits im Säuglingsalter (unter 9 Monaten) angestrebt. Auch zusätzliche Fehlbildungen des Herzens, stattgehabte Endokarditis, zunehmende Ventrikelgröße, zunehmender pulmonaler Blutfluss über den systemischen Fluss (Qp:Qs 1,5:1 – 2:1) oder Anzeichen eines ansteigenden pulmonal-arteriellen Widerstandes gelten als Indikation zur VSD-Korrektur (Minette 2006, King 1999). Dabei ist der primäre Verschluss soweit möglich dem pulmonal-arteriellen Banding vorzuziehen, welches häufig mit Schwierigkeiten bei Ent-

fernung und Rekonstruktion der Pulmonalarterie, Pulmonalstenosen und einer höheren kumulativen Letalität durch den Zweiteingriff verbunden ist (Schuhmacher 2008).

### 1.3 Bisherige Therapiemöglichkeiten der VSDs und ihre Grenzen

#### 1.3.1 Chirurgische Therapiemöglichkeiten

Bereits zu Beginn der Ära der offenen Herzchirurgie wagte sich der Amerikaner Charles P. Bailey 1953 über einen rechtsventrikulären Zugang an den direkten Nahtverschluss eines VSDs. Trotz Hypothermie und Okklusion der Venae cavae gestaltete sich die Lokalisation des Defektes und seiner Begrenzungen ohne direkte Aufsicht als äußerst schwierig. Bereits wenige Tage nach Operation war ersichtlich, dass ein hochgradiger Restshunt verblieben war (Westaby 1994). Erst durch den Gedanken der extrakorporalen Zirkulation gelang es Lillehei 1954 in einer spektakulären Operation mit sogenannter „cross circulation“ einen VSD unter direkter Sicht zu verschließen (Lillehei 1955). Dabei wurden die Vena jugularis interna zur venösen Drainage und die Arteria carotis communis für den Rückfluss des sauerstoffreichen arteriellen Blutes kanüliert. Als „Donor“ des sauerstoffangereicherten Blutes fungierte der Vater des Patienten über Kannülen an Arteria femoralis und der Vena saphena magna. Eine Motorpumpe sorgte für einen kontinuierlichen Fluss von 40 ml/kg Körpergewicht pro Minute zwischen den beiden Kreisläufen. Mit Einführung des von Gibbon entwickelten Pumpen-Oxygenators zum Ersatz des menschlichen Sauerstoffdonors konnte der chirurgische Direktverschluss ventrikulärer Septumdefekte endgültig als Standardtherapie etabliert werden (Westaby 1994). Bis heute stellt der chirurgische Verschluss mit oder ohne Patcheinnahm den Goldstandard der Therapie singulärer VSDs, sowie der Korrektur von VSDs mit assoziierten kardialen Fehlbildungen dar. Die Septumdefekte können meist unter direkter Aufsicht verschlossen und gegebenenfalls notwendige Zweiteingriffe in derselben Sitzung durchgeführt werden (Roos- Hesselink 2004, Aleem 2006). Der dazu notwendige kardiopulmonale Arrest an der Herz- Lungen-Maschine (HLM) stellt bei allen Fortschritten der herzchirurgischen Therapie allerdings bis heute einen ihrer größten Diskussionspunkte dar. Seit Einführung der extrakorporalen Zirkulation 1954 konnten große technische Verbesserungen erzielt werden und die Patienten-Kompatibilität deutlich gesteigert werden (Edmunds 2004). Die Gefahren der systemischen Entzündungsreaktion (SIRS), der darauffolgenden Ödembildung und Enzephalopathie, sowie die Entstehung von Thromb- /Luftembolien sind allerdings bis heute gegeben (Wildhirt 2001, Shann 2008). Über die Langzeitauswirkungen auf den kindlichen Organismus ist derzeit nur wenig bekannt. Allerdings konnte in einigen Studien bereits eine verlangsamte neurologische Entwicklung, insbesondere bezüglich motorischer Fertigkeiten, in kleinen Patienten nach Herzoperationen mit HLM nachgewiesen werden (Bellinger 1995, Bellinger 1999, Wypij 2003, Ballweg 2007, Gessler 2009). Ein weiteres Problemfeld des chirurgischen Verschlusses ist der adäquate Zugangsweg zu den verschiedenen Lokalisationen der Septumdefekte. Bei nahe der Klappenebene gelegenen perimembranösen Defekten wird heute standardmäßig der transatriale Zugangsweg zur rechten Septumseite gewählt. Auch supracristale und

Cono-Defekte lassen sich gut erreichen und zeigen gute Ergebnisse hinsichtlich Mortalität, dem Auftreten von Blockbildern, Rest-VSDs und Re-Operationen (Aleem 2006).

Bei Neugeborenen mit großen Defekten, muskulär-apikalen, anterioren und multiplen muskulären Defekten („swiss cheese septum“) dagegen, konnten bisher nur suboptimale Operationsergebnisse erreicht werden (Prêtre 1999, Aleem 2006, Diab 2007). VSDs auf Höhe oder unterhalb des Moderatorbandes können transatrial nur schwer eingesehen werden. Die ausgeprägte Trabekularisierung des RV sowie die zunehmende Hypertrophie bei länger bestehender Rechtsherzbelastung behindern eine konkrete Lokalisation des Defektes und Platzierung des verschließenden Patches (Prêtre 1999, Padalino 2000). Auch bei direktem Zugang über eine rechtsventrikuläre Inzision ist das Problem der schwierigen Defektlokalisierung nach wie vor gegeben. Padalino et al. publizierten den Versuch einer tiefen infundibulären Inzision des rechten Ventrikels zur direkten Aufsicht apikaler VSDs. Mit sehr geringer Mortalität und ohne nachweisbare Restshunts scheint dies der geeignetste Zugang zu apexnahen Defekten zu sein. Zudem konnte in der Studie von Geva et al. nachgewiesen werden, dass der bei Padalino et al. inzidierte infundibuläre Ventrikelbereich lediglich 20% zum Gesamt-Herzzeitvolumen beiträgt. Der Hauptteil des Herzzeitvolumens (80%) wird hiernach durch die Arbeit des Inlet- und apikalen Bereichs der linken Kammer gestellt.

Der bisher bei apikal gelegenen Defekten verwendete Zugang über eine fischmaulartige Inzision am linksventrikulären Apex ermöglicht zwar eine freie Sicht auf die gleichmäßige Oberfläche der linken Septumseite (Wollenek 1996, Prêtre 1999), zeigt andererseits aber oft vielbestätigte Komplikationen wie linksventrikuläre Dysfunktion und Arrhythmien durch Narbengewebe, Aneurysmabildung und schlechte Langzeit-Ergebnisse (Hanna 1999, Liu 2008).

Wollenek et al. dagegen konnten im Langzeit-Follow-up auch 11 Jahre nach linksventrikulärem Zugang gute funktionelle Ergebnisse ohne Wandabnormalitäten aufzeigen. Aber wie auch Liu et al. bemessen sie der präoperative Diagnostik entscheidende Bedeutung zu. Um gute Langzeit-Ergebnisse zu erzielen sollte ein derartiger Zugangsweg daher nur bei selektivem Patientengut angewendet werden (Wollenek 1996, Liu 2008). Gerade bei solch schwierigen Therapieentscheidungen wird daher zunächst in der Hoffnung auf einen Spontanverschluss und/oder Verkleinerung des VSDs ein palliatives pulmonalarterielles Banding bevorzugt und dessen mögliche Komplikationen in Kauf genommen (Wollenek 1996, Schumacher 2008).

### **1.3.2 Interventionelle Therapiemöglichkeiten**

Lange Zeit war dem Herzkatheterlabor der rein diagnostische Aspekt vorbehalten. Evaluation der kardialen Hämodynamik und der Druckverhältnisse, Beurteilung der Koronarien und Myokardbiopsien nach Herztransplantation stellten den Hauptteil der täglichen Eingriffe dar. Dabei war es Rubio-Alvarez in Mexiko bereits 1953 gelungen eine Pulmonalklappenstenose interventionell zu inzidieren (Rubio-Alvarez 1953). Der Eingriff

geriet aber bald in Vergessenheit. Erst knapp 13 Jahre später legten Rashkind und Miller den Grundstein der interventionellen Kinderkardiologie: Die Ballon-Atrioseptostomie (Rashkind 1966). Etwa zur gleichen Zeit erprobte auch Porstmann die Möglichkeit eines rein kardiologisch interventionellen Korrekturingriffs. Mittels eines Ivalon- (Polyvinyl) Propfens gelang es ihm einen persistierenden Ductus arteriosus (PDA) zu verschließen und damit die erstmalige Machbarkeit einer interventionellen Shunt-Okklusion zu beweisen (Porstmann 1967). Zehn Jahre später setzten Mills, Kings et al. den ersten Entwurf einer Doppelschirmprothese für den interventionellen Verschluss von Vorhofseptumdefekten (ASDs) und PDAs in fünf Patienten erfolgreich ein. In einem späten Follow-up nach 27 Jahren konnten in vier der damals fünf Patienten gute Langzeitergebnisse dieser Systeme gezeigt werden (Mills 1976, Mills 2003, Abb. 3).

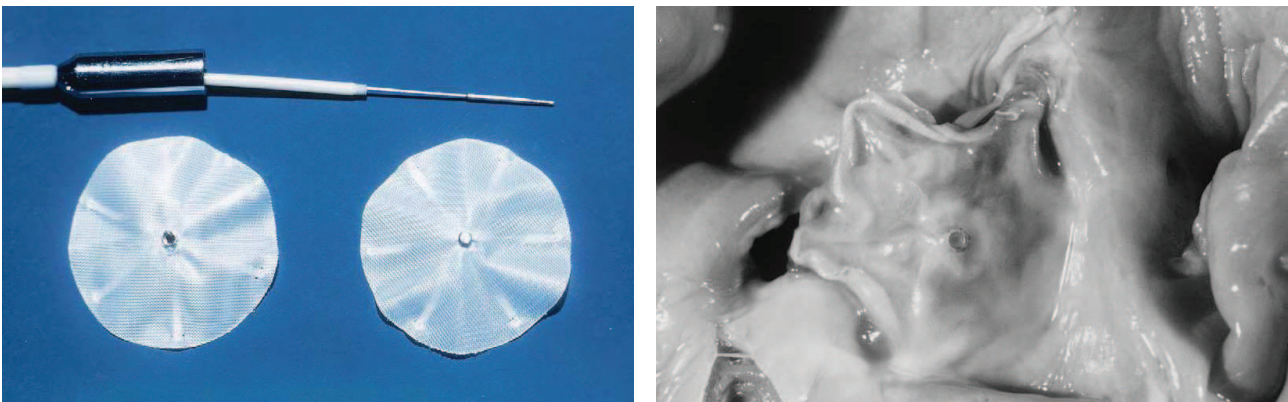


Abb. 3: Links: Mills-Kings' „Double-umbrella-device“; Rechts: Postmortem Fotografie eines von Endothel überwachsenen Systems (aus Mills et al. 2003)

Allerdings benötigte das „Mills-Kings double-umbrella device“ wie auch der von Porstmann verwendete Ivalon-Propfen selbst für das venöse System unverhältnismäßig große Schleusen, so dass es im klinischen Gebrauch nicht weiter verwendet wurde (Mullins 1998). Bis Ende der 90er Jahre wurde eine Vielzahl verschiedener Systeme zum Verschluss atrialer Septumdefekte entwickelt und auch erfolgreich eingesetzt (Abb. 4).

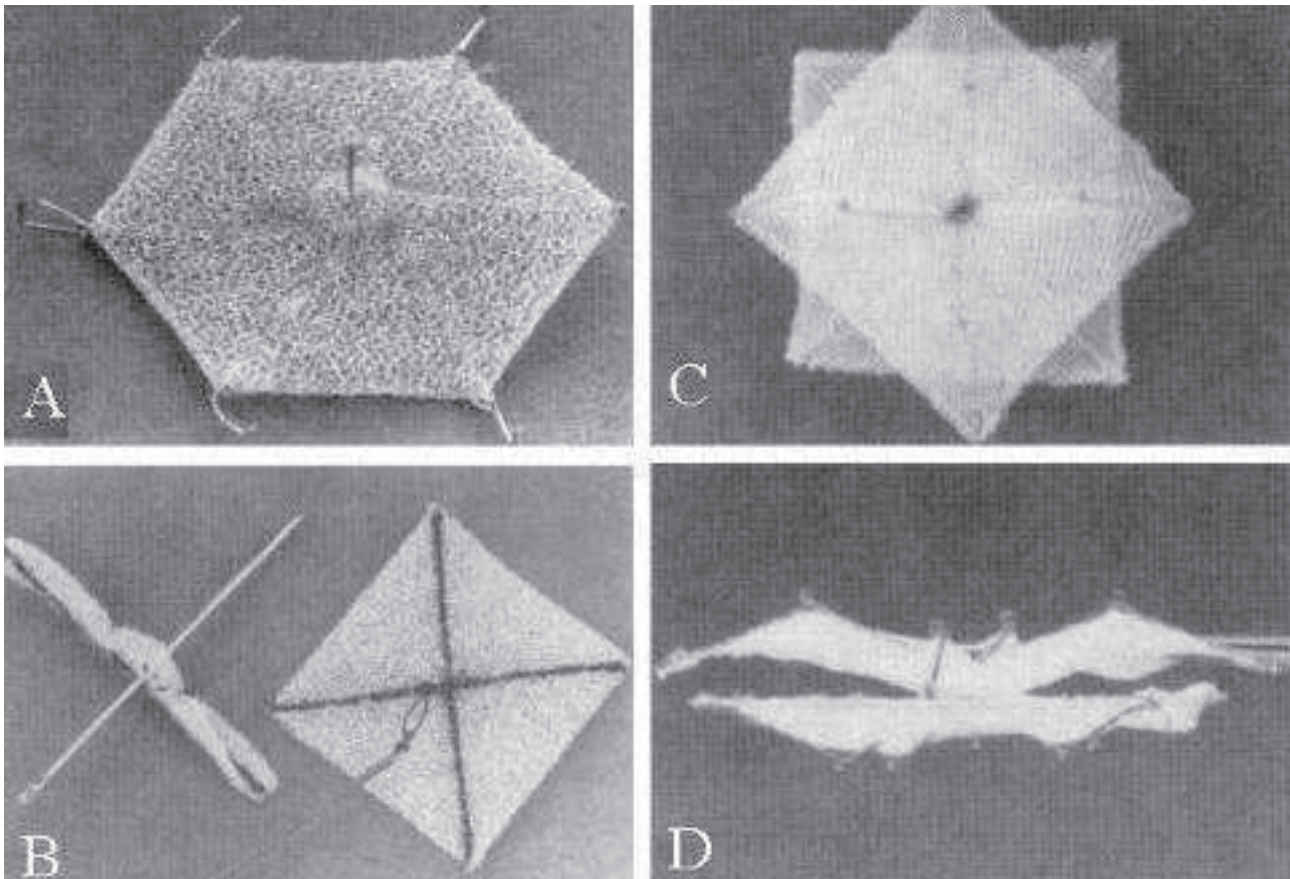


Abb. 4: Verschiedene Schirmsysteme, die zur Therapie des VSDs eingesetzt wurden: A, Rashkind Doppelschirm; B, Sideris „Buttoned System“; C und D, „Clamshell System“, später in „Cardioseal umbenannt“, (Bilder der Arbeitsgruppe Hijazi 2001)

Die Verwendung zum Verschluss von VSDs blieb dabei geringen Fallzahlen mit mehr oder minder großem Erfolg vorbehalten (77-100% ohne residuellen Shunt (RVSD), Wahl 2009): Rashkind 1977, Lock 1988, Sideris 1997, Kalra 1999, Latiff 1999, Thanopoulos 1999, Tofeig 1999, Hijazi 2000 u.a. (Tab. 1).



Autoren	Jahr	Anzahl der Patienten	Diagnose	Verschlusstechnik	Verschlussergebnisse und Komplikationen
Lock et al.	1988	6	3 post-InfarktVSDs, 3 pmVSDs, 1 mVSD	Rashkind double umbrella	5/6 RVSD, 4 verstorben, 1 Kompletverschluss
O'Laughlin et al.	1989	1	RVSD nach Fontan-Operation	Rashkind double umbrella	Verkleinerung des Shuntvolumens
Bridges et al.	1990	12	pm- und mVSDs	Rashkind double umbrella	Verkleinerung des Shuntvolumens
Preminger et al.	1994	7	mVSDs	Rashkind double umbrella	Verkleinerung des Shuntvolumens
Van der Velde et al.	1994	29	mVSDs	Bard Clamshell	83% RVSDs
Rigby et al.	1994	13	pmVSDs	Rashkind double umbrella	10/13 erfolgreich platziert
Vogel et al.	1996	1	pmVSD	Rashkind double umbrella	RVSD, Perforation der Aortenklappe, chirurgischer Verschluss
Sideris et al.	1997	25	15 pmVSDs, 3 mVSDs	Buttoned device	18/25 erfolgreich platziert, 5/18 RVSDs, 1 cAVB
Lee et al.	1998	1	Post-Infarkt-VSD	Amplatzer septal occluder (ASO)	Trivialer Restshunt
Tofeig et al.	1998	1	mVSD	Amplatzer VSD occluder (AVSDO)	Trivialer Restshunt
Thanopoulos et al.	1999	6	mVSDs	AVSDO	Kein RVSD, 2 transiente LSBs
Janorkar et al.	1999	16	mVSDs	Rashkind double umbrella	2/16 verstorben, 9/16 RVSD direkt nach Verschluss, 5/16 RVSD nach 6 und 12 Monaten
Latiff et al.	1999	1	mVSD	Gianturco coil	Kleiner Restshunt
Kalra et al.	1999	30	28 pmVSDs, 2 mVSDs	Rashkind double umbrella	87% erfolgreich platziert, 30% RVSDs, 1 embolisiert
Rodes et al.	2000	1	mVSD	Amplatzer duct occluder (ADO)	Kein RVSD nach 4 Monaten

Tab. 1: Arbeiten zum VSD-Verschluss bis 2000 mit variablen Verschlussystemen

(Arbeitsgruppe Hijazi 2001); cAVB = kompletter AV-Block, LSB = Linksschenkelblock

Die ASD-Verschluss-Systeme konnten hier den Anforderungen zur Verwendung im perimembranösen und muskulären Ventrikelseptum nicht genügen. Geringe Flexibilität des Materials, große Schleusen (>10F), komplexe Implantationstechnik, fehlende Repositions- und Rückzugsmöglichkeit, Beeinträchtigung der Funktion von Aorten (AK)- und Trikuspidalklappe (TK) sowie eine hohe Rate residueller Shunts (35-100%) verhinderten einen breitflächigen Einsatz der interventionellen Systeme und machten den VSD-Verschluss lange zu einer der großen Domänen der Herzchirurgie (Arora 2004, Wahl 2009).

Erst mit Einsatz neuerer modifizierter und speziell für den Gebrauch am Ventrikelseptum einsetzbaren Device wie Nit-Occluder und Amplatzer-Systeme (Abb. 5 und 6) rückte der interventionelle VSD-Verschluss wieder mehr ins Licht des wissenschaftlichen Interesses. Nach initial sehr guten Verschlussraten, einfacher Handhabung und der Möglichkeit, eigens für perimembranöse oder muskuläre VSDs entwickelte Devices einzusetzen, verdrängten die Amplatzer-Systeme alle bisher verfügbaren Verschlussysteme weitgehend vom Markt. Für den Nit-Occluder sind bisher nur Einzelstudien und keine übergreifenden Ergebnisse bekannt (Arora 2003, Ewert 2004, Michel-Behnke 2005).

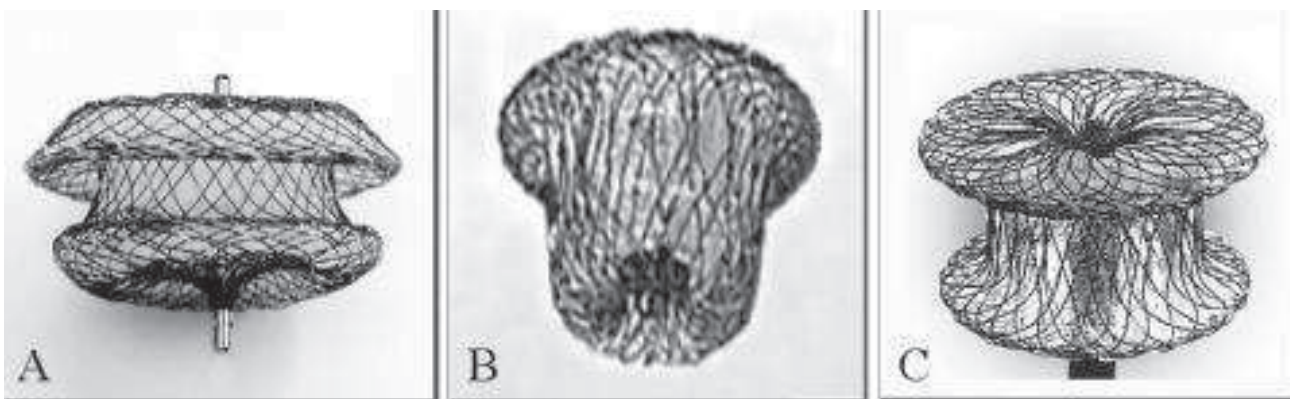


Abb. 5.1: Amplatzer Systeme, die bisher für den Verschluss von VSDs genutzt wurden. Obere Reihe: Kommerziell erhältliche Amplatzer Verschlussysteme. Okkluder für A) ASDs; B) PDAs; C) mVSDs.

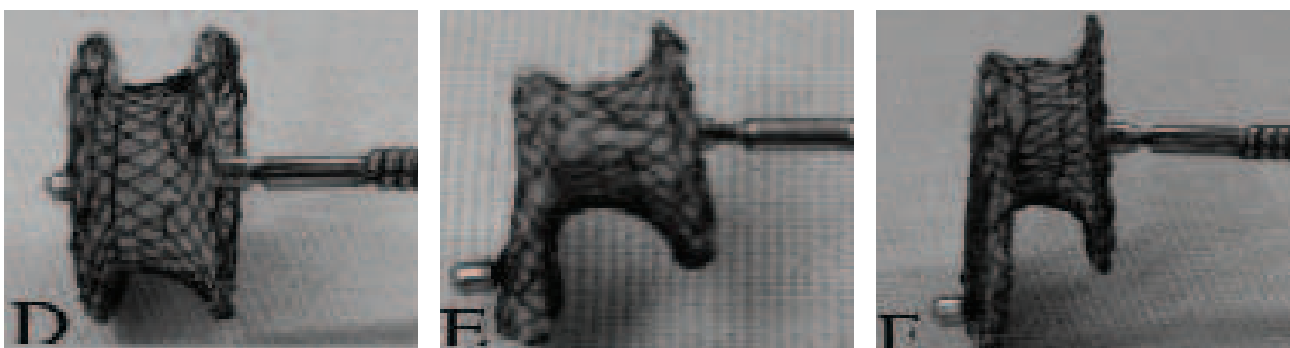


Abb. 5.2: Prototypen neuer Bauart; D) konzentrischer Okkluder, E)/F) exzentrische Okkluder (Arbeitsgruppe Hijazi 2001).



Abb. 6: Pfm-Nit-Occluder. A) und B) Nit-Occlud-VSD-Spiralen mit eingewebten synthetischen Fasern für den schnelleren Verschluss durch erhöhte Thrombogenität; C) Nit-Occlud-PDA-Device (Abbildungen der Fa. Pfm AG, Köln)

Nach erstmaligem Einsatz der neuen, für das Ventrikelseptum bestimmten Amplatzersysteme an Hunden 1999 mit 100%-iger Verschlussrate (Amin 1999 (B)) konnten Tofeig et al. 1999 die erste Implantation am Menschen mit minimalem Restshunt durchführen. In den nachfolgenden Jahren stiegen die Fallzahlen der perkutan verschlossenen VSDs rapide an (Hijazi 2000, Chessa 2002, Hijazi 2002, Arora 2003, Bass 2003, Thanopoulos 2003, Arora 2004, Ewert 2004, Holzer 2004, Pedra 2004, Michel-Behnke 2005, Thanopoulos 2005, Butera 2006, Fu 2006, Carminati 2007, Diab 2007, Chessa 2008, Bjørnstad 2009).

Mit erfolgreich durchgeführten Eingriffen in 87% - 100% der Fälle, erfolgreichem Verschluss von im Schnitt 96% und niedriger Komplikationsrate (2,28% schwerwiegende Akutkomplikationen) ist der interventionelle Verschluss in erfahrenen Händen und selektiertem Patientengut dem chirurgischen ebenbürtig (Butera 2007, Carminati 2007, Zheng 2009).

Mit zunehmenden Fallzahlen fiel allerdings auch immer mehr das Auftreten von kompletten AV-Blöcken (cAVBs) bei interventionellem Verschluss perimembranöser Ventrikelseptumdefekte ins Gewicht (3,6% bei Butera et al. 2006, 8,6% bei Fu et al. 2006, 5,0% bei Carminati et al. 2007, 22% bei Predescu et al. 2008, 4% bei Bjørnstad 2009). Während auch beim chirurgischen Verschluss in bis zu 5% mit dem Auftreten eines kompletten AV-Blocks direkt nach dem Eingriff nahe des Reizleitungssystems zu rechnen ist, kam es bei den perkutan therapierten Patienten vor allem auch im follow-up weit nach Entlassung zu dieser lebensbedrohlichen Rhythmusstörung (3,6% bei Butera 2006 nach 24 Monaten follow-up, 2% bei Holzer 2006 nach 6 Monaten follow-up, 1,5% bei Carminati 2007 nach 4, 7 12 und 18 Monaten, Einzelfallbeschreibung bei Yalonetsky 2009 nach einem follow-up von 3 Jahren). Auch wenn weiterhin gute Verschlussraten erzielt werden konnten besteht derzeit aufgrund der Gefahr des Auftretens später cAVBs der allgemeine Konsensus vor weiterer Implantation der Amplatzersystems für pmVSDs die Entwicklung neuerer, risikoärmerer Systeme abzuwarten.

Mit Abstand zum Reizleitungssystem ist das Auftreten cAVBs bei interventionellem Verschluss von mVSDs eher selten. Mit 0,8 % permanenten Leitungsstörungen liegt die Inzidenz bei Carminati et al. unter der Inzidenz bei chirurgischem mVSD-Verschluss (Carminati 2007). Vielmehr gibt es nach wie vor eine ganze Reihe an Kriterien, die die Selektion des für den interventionellen Eingriff geeigneten Patientengutes stark einschränken. Auch in sehr erfahrenen Zentren und unter optimaler Ausschöpfung der bildgebenden Technik zeigt sich ein

deutlich erhöhtes prozedurales Risiko für Patienten unter 5 kg. Gewicht und Alter korrelieren bei diesen Eingriffen signifikant mit dem Auftreten früher schwerwiegender Komplikationen (Holzer 2004, Carminati 2007, Diab 2007). Limitierter vaskulärer Zugang, mögliche haemodynamische Instabilität, Rhythmusstörungen und Klappenschäden durch Manöver der Katheter machen den interventionellen Verschluss in kleinen Patienten zu einer großen Herausforderung für die behandelnden Ärzte (Bacha 2005 (A), Carminati 2007, Phillips 2009). Gerade im frühen Säuglingsalter allerdings wäre ein zeitnahe und definitiver Verschluss erstrebenswert, um die Auswirkungen eines hämodynamisch wirksamen Shunts auf Herz- und Lungenfunktion möglichst gering zu halten und die Nachteile des palliativen „Bändchens“ wie das Risiko des Zweiteingriffs mit Komplikationen bei Entfernung des Bändchens, Entwicklung einer infundibulären Pulmonalstenose (PS) und Entwicklung einer Subaortenstenose oder – insuffizienz, zu umgehen (Schuhmacher 2008).

### **1.3.3 Die Hybridtherapie**

Der Begriff der sogenannten „Hybridtherapie“, wie er heute in der Kardiologie und Herzchirurgie verwendet wird, bezeichnet eine Kombination aus chirurgischen und interventionellen Techniken mit dem Ziel die Therapie angeborener und erworbener Herzerkrankungen zu optimieren und deren Limitationen zu reduzieren (Bacha 2005 (A)). Bhati et al. verwendeten diesen Begriff erstmals 1972 zur Beschreibung einer chirurgisch interventionellen Anlage eines Blalock-Taussig-Shunts (Bhati 1972).

Die ersten Versuche VSDs in Hybridtherapie zu verschließen fanden unter extrakorporaler Zirkulation mit Hilfe eines Rashkind-Doppelschirm-Implantates statt. Dieses wurde in 8F – 11F Schleusen appliziert. Nach Eröffnung des RA wurde die jeweilige Schleuse über die Trikuspidalklappe in den RV und von dort über den VSD in den LV vorgeschoben. Hier konnte so zunächst der distale Anteil des Verschlusssystems entfaltet werden. Anschließend folgte unter Rückzug der Schleuse in den rechten Ventrikel die Entfaltung des proximalen Anteils. Zur zusätzlichen Sicherung wurde der Rashkind-Doppelschirm hier mit zwei Stichen am rechtsventrikulären Septummyokard fixiert (Chaturvedi 1996).

Die Ergebnisse dieser ersten Hybrideingriffe konnten allerdings nicht überzeugen: Die Rate der Fehlversuche lag bei 20-40% mit einer Mortalitätsrate von 14-25% (Fishberger 1993, Chaturvedi 1996, Murzi, 1997, Okubo 2001). Die erste Implantation ohne HLM am schlagenden Herzen wurde 1998 von Amin et al. durchgeführt (Amin 1998).

Zu den Vorteilen eines solchen Eingriffs in Hybridtherapie zählt vor allem das Vermeiden der HLM, die sofortige Kontrolle des Verschlussresultates am schlagenden Herzen und Minimierung der Risiken rein interventioneller Methoden wie Klappenschäden und hämodynamische Instabilität (Bacha 2003, Crossland 2008). Bei Korrektur komplexer Herzfehler könnte die Bypasszeit deutlich vermindert und die Komplexität des Eingriffs insgesamt reduziert werden (Hjørtdal 2002). Bei einfachem VSD-Verschluss wäre ein minimalinvasiver Zugang möglich. Da oftmals kein vaskulärer Zugang nötig ist, könnte die Hybridtherapie auch in Säuglingen und Kleinkindern unter 5 kg und schwierigem Gefäßstatus durchgeführt werden (Bacha 2005 (A), Philipps 2009). Mit zunehmender technischer Verbesserung der Verschlussysteme hin zum selbstzentrierenden Implantat, größerer Flexibilität der Systeme und Nutzung der transösophagealen oder epikardialen Echokardiographie konnten in den letzten Jahren erste vielversprechende VSD-Verschlussstudien zur Hybridtechnik gezeigt werden (Bacha 2005 (A), Bacha 2005 (B), Diab 2005, Bacha 2007, Crossland 2008). Allerdings zeigen die bisher verfügbaren Systeme, die zum Verschluss muskulärer VSDs entwickelt wurden, immer noch zahlreiche Limitationen, die den flächenhaften Einsatz im Klinikalltag verhindern. So beschreiben Bacha et al. zum einen das Auftreten von Trikuspidalklappeninsuffizienzen (TIs) durch Anschlagen der Klappensegel an das vorstehende, großvolumige Verschlussystem oder Beeinträchtigung der Sehnenfäden. Zudem führten Probleme bei Entfaltung der rechtsventrikulären Scheibe der AVSDOs im stark trabekularisierten rechten Ventrikel zu Fehlpositionierung und konsekutivem Restshunt (Bacha 2007). Crossland et al. weisen darauf hin, dass die geringen Fallzahlen der bisherigen Hybridstudien bisher keine Rückschlüsse bezüglich der Mortalitätsraten, des Langzeitverhaltens und –sicherheit der Verschlussysteme zulassen. Weiterführende Studien zum Einwachsverhalten und der Gefahr später Embolusbildung der Systeme sind für die weitere Entwicklung wichtig (Crossland 2008, Scheuermann 2006, Vogt 2009). Diab et al. betonen darüber hinaus, dass für den Erfolg der Hybridtherapie der mVSDs der weitreichende Einsatz bildgebender Verfahren eine essentielle Rolle spielt (Diab 2005). Aus diesen Ausführungen lässt sich ableiten, dass nach diesen außerordentlich vielversprechenden Ansätzen zur Hybridtherapie der mVSDs ein großer Bedarf an weiterführenden therapeutischen Strategien und neuen, optimierten Verschlussystemen besteht.

Daher etablierte unsere Arbeitsgruppe zunächst ein Großtiermodell zur artifiziellen Schaffung von mVSDs (Kozlik-Feldmann 2008 (A)). In der Fachliteratur existiert bislang kein Bericht eines Großtiermodells mit einem angeborenen muskulären Defekt. Bei den vor allem während der Amplatzer-Versuchsreihen verwendeten Tieren handelt es sich um Minischweine der Yucatan-Rasse mit angeborenen perimembranösen VSDs (Swindle 1990, verwendet u.a. bei Amin 1999 (B), Gu 2000, Amin 2004). Diese dürfen zudem nicht vom amerikanischen in den europäischen Raum exportiert werden und stehen daher hierzulande nicht als Tiermodell zur Verfügung. Kozlik-Feldmann et al. ist es in einer ersten Tiermodell-Studie gelungen in allen verwendeten Versuchstieren einen relevanten mVSD zu kreieren und so eine wichtige Grundlage für alle nachfolgenden Versuchsreihen der Arbeitsgruppe zu schaffen. Die verwendete Technik wird unter 2.2 ausführlich beschrieben.

Die Bostoner Kooperationsgruppe um Professor del Nido et al. hatte bereits 2006 in ihrer Studie zum ASD-Verschluss am schlagenden Herzen unter RT3DE und Video-assistierter Cardioskopie (VAC) ein neuartiges

selbst-expandierbares „Patch-Verschlussystem“ verwendet (Vasilyev 2006). Dieses bestand aus einem faltbaren „Nitinol“-Rahmen, in das ein Dacron-Patch eingespannt war. Nach Entfaltung und Platzierung vor dem ASD wurde der Patch mittels kleiner V-förmiger „Nitinol“-Klammern fixiert, welche über ein endoskopisches Klammernahtgerät eingebracht werden konnten. Anschließend konnte der Rahmen vom Patch gelöst werden. Letzterer verschloss den ASD in allen fünf Versuchstieren suffizient. (Abb. 7)

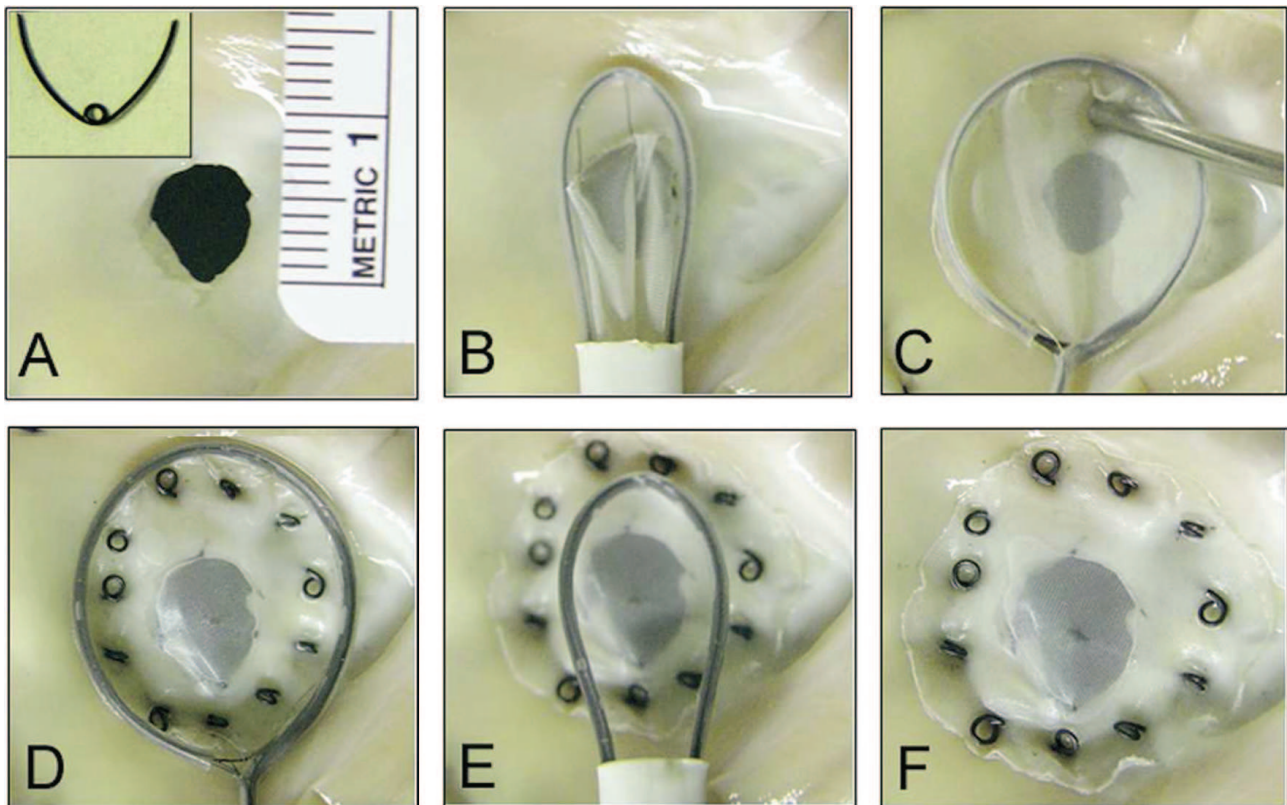


Abb. 7: Prototyp des Patchverschlusssystems aus der Publikation des Bostoner Kooperationsteams 2006, hier in der ex-vivo Demonstration (Vasilyev 2006).

Der mit Hilfe von Dr. Franz Freudenthal von der pfm-AG in Köln entwickelte Prototyp wurde zwei Jahre später von der Arbeitsgruppe wieder aufgegriffen und im Zuge der präklinischen Entwicklung einer neuartigen Hybridtechnik zum mVSD-Verschluss angewandt. Unter RT3DE-Kontrolle gelang es das Patchsystem über eine apikale linksventrikuläre Inzision vor dem mVSD zu platzieren. Über eine zweite linksventrikuläre Inzision wurde der Klammerapplikator eingebracht und der Patch über dem mVSD befestigt (Abb. 8).

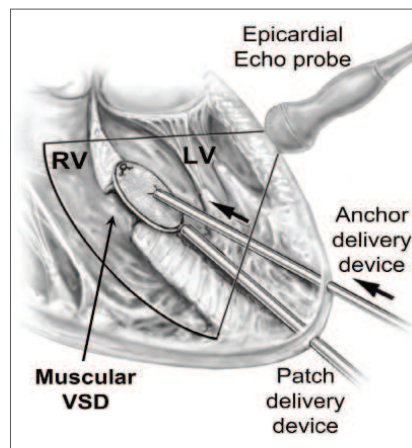


Abb. 8: MVSD-Verschluss mit zweifacher linksventrikulärer Inzision nach der Methode von Vasilyev 2008.

Während die Bostoner Arbeitsgruppe vorrangig Aspekte einer neuartigen RT-3D-Echokardiographischen Darstellung des mVSD-Verschlusses am schlagenden Herzen untersuchte, fokussierten sich Kozlik-Feldmann et al. zeitgleich auf die technische Weiterentwicklung des Prototyps hin zu einer wahren Hybridtechnik nach der Definition von Bacha 2005. Zur Vermeidung einer zweifachen linksventrikulären Inzision wurde das Verschlussystem unter Zusammenarbeit mit Herrn Freudenthal und Herrn Jung von der Pfm- AG so modifiziert, dass eine Platzierung des Patchsystems über einen arteriellen Gefäßzugang in interventioneller Herzkatheter-technik möglich wurde. Da das System speziell für Patienten entwickelt wurde, die nicht unbedingt über einen transatrialen VSD-Zugang versorgt werden können, verblieb als herzchirurgischer Anteil der neuen Hybridtechnik der transventrikuläre Zugang für das Fixationsgerät (Ausführliche Beschreibung von Material und Methodik unter 2.3 – 2.5).

In der Großtierstudie von Kozlik-Feldmann et al. 2008 konnte so an insgesamt 6 Versuchstieren ein künstlich geschaffener mVSD erfolgreich verschlossen werden und die Machbarkeit der neu entwickelten Hybridtechnik ohne kardiopulmonalen Bypass gezeigt werden. Aussagen zu linksventrikulären Funktionsstörungen im follow-up und histologische Ergebnisse zum Einwachsverhalten des Patches konnten aber in dieser Akutstudie noch nicht erhoben werden, so dass sich die Notwendigkeit einer chronischen Versuchsreihe ergab.

## 1.4 Biokompatibilität bisheriger VSD-Verschlussysteme

### 1.4.1 Die Bedeutung der histologischen Untersuchung explantierter Systeme

Die junge Disziplin der Hybridtherapie angeborener Herzfehler hat es geschafft die Spannweite für den Einsatz interventioneller Verschlussysteme (Duct-Occluder, ASD-Schirmchen, VSD-Verschlussysteme) enorm zu erweitern. Die Studien um neue Implantate und Implantationstechniken umfassen dabei allerdings meist die Machbarkeit der Methoden und klinische Ergebnisse (Sigler 2007). Die hämodynamischen und histopathologischen Auswirkungen der eingesetzten Systeme auf den wachsenden Körper der jungen Patienten werden erst seit kurzem zunehmend untersucht (Kreutzer 2001, Sigler 2005, Sigler 2006a, Sigler 2006b, Sigler 2007, Foth 2009, Vogt 2009). Bei den Tierstudien zur Biokompatibilität aus früheren Jahren war aus Gründen der Zeit- und Kosteneffektivität keine Langzeitbeobachtung möglich (Kuhn 1996, Amin 1999 (A), Amin 2004). Zur genauen immunhistochemischen Evaluation beschrieb vor Foth et al. 2009 nur eine einzelne Forschergruppe Ansätze einer solchen Explantatuntersuchung (Bauriedel 2007). Dabei werden die Implantate bei Kindern mit angeborenen Shunt-Erkrankungen zum lebenslangen Verbleib im menschlichen Herzen entwickelt und auch klinisch in dieser Intention eingesetzt (Sigler 2005, Sigler 2007, Foth 2009). Die Gründe für die bisher geringe Anzahl an Untersuchungen zum Einwachsverhalten und der Gewebeverträglichkeit liegen wohl zum einen an den geringen Fallzahlen der bis zum Jahr 2000 perkutan oder in Hybridtechnik implantierten Verschlussysteme, zum anderen aber auch an den hohen Anforderungen und dem hohen technischen Aufwand einer histopathologischen Beurteilung des Untersuchungsmaterials (Sigler 2007, Foth 2009). Vor allem das Einbetten in Kunstharz und die Schleif-Schnitt-Technik metall- oder „Nitinol“-haltiger Präparate benötigen dabei erfahrene Untersucher und spezialisiertes Equipment (Sigler 2000, Sigler 2006a, Sigler 2006b, Sigler 2007). Zudem ergaben sich immer wieder technische Schwierigkeiten bei der immunhistochemischen Anfärbung des deplastinierten Untersuchungsmaterials. Quentin et al. publizierten 2009 eine neuartige Färbemethode, die eine bessere Fixierung des Gewebes auf dem Glasträger garantiert und so die Deplastifikation und nachfolgende histomorphometrische und qualitative Materialanalyse vereinfacht (Quentin 2009). Nach dieser Technik gelang Sigler et al. erstmalig eine serielle Multicenter-Studie zu explantierten Verschlussystemen in 10 humanen Gewebeproben (Foth 2009). Hier konnte zum einen ein definierter zeitlicher Verlauf für das typische histopathologische Integrationsverhalten der Systeme festgelegt werden (Tab. 10 unter 4.4.1.3), der die bisher gängige Praxis der postinterventionellen antikoagulatorischen Therapie für mindestens 6 Monate unterstützt. Zum anderen konnte bei allen bislang verwendeten Verschlussystemen eine entzündliche Fremdkörperreaktion des angrenzenden Myokards beobachtet werden, die auch nach Jahren noch in chronischer Form persistiert und deren Langzeitauswirkung noch in weiteren Studien zu prüfen ist.

Gerade mit der rasch zunehmenden Anzahl der erwachsenen Patienten mit angeborenen Herzfehlern (EMAH) wird auch der Langzeit-Biokompatibilität perkutaner Implantate immer größere Be-



deutung zukommen, so dass sie bei allen neu entwickelten Verschlusssystemen ein wichtiges Kriterium für einen späteren Einsatz im klinischen Alltag darstellen wird.

#### 1.4.2 Verträglichkeit des „Nitinols“ als Grundbaustein perkutaner Implantate

„Nitinol“ ist ein Akronym für die Nickel (Ni)-Titan (Ti)-Legierung, die 1963 von Bühler und Kollegen in den Naval (N) Ordnance (O) Laboratories (L) entwickelt wurde. Die Metallverbindung enthält dabei zu 55% Nickelionen und zu 45% Titanionen. Nitinol ist nur gering temperatur- und druckempfindlich (Schmelzpunkt  $1300^{\circ}\text{C}$ ), korrosionsfest und nicht magnetisch (Barras 2000). Durch die zusätzliche besondere Eigenschaft des „Formgedächtnisses“ sind Nitinol-Rahmenkonstrukte das ideale Ausgangsmaterial zur Verwendung in perkutan implantierbaren Systemen. Als „Formgedächtnis“ bezeichnet man dabei die Fähigkeit der Metalllegierung innerhalb eines definierten Temperaturbereichs oder einer definierten Belastungsspanne („Martensit“) um bis zu 8% elastisch-plastisch verformbar zu sein (Singh 2007). Zurück in der Ausgangslage („Austenit“) nimmt das Nitinol die ihm in mehreren Metallverarbeitungsschritten eingeprägte Form wieder an (siehe Hystereseschleife Abb. 9). Die entsprechend dem anatomischen Nutzen vorgeformten ASD-, VSD- oder PDAVerschlusssysteme können somit gefaltet, in Katheter eingebracht und intrakardial platziert werden. Dort werden sie völlig deformationsfrei entfaltet (Barras 2000).

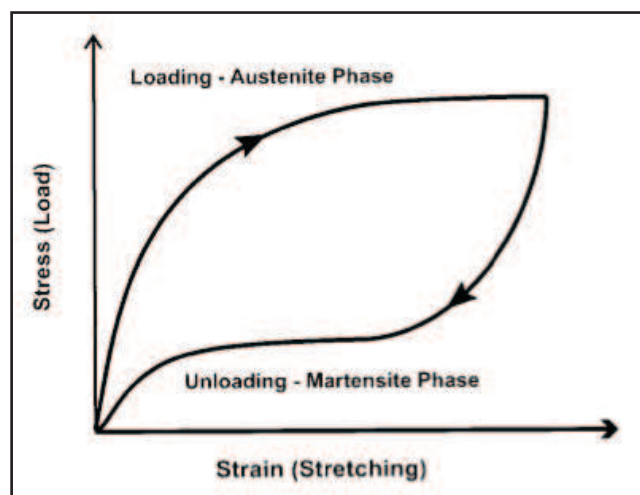


Abb. 9: Hystereseschleife des Nitinols (aus Barras 2000)

Neben den vielen günstigen Materialeigenschaften gab allerdings der Nickel-Anteil von 55% immer wieder Anlass zur Diskussion der Verträglichkeit Nitinol-haltiger Implantate (Ries 2003, Lai 2005). In Fallstudien wurde von allergischen Reaktionen wie etwa Fieber, Atembeschwerden, Kopfschmerzen, Urtikaria, Ödemen bis hin zu Vorhofflimmern und Perikarditis berichtet (Dasika 2003, Fukahara 2003, Singh 2004, Lai 2005, Ri-

gatelli 2007, Kim 2008). In wenigen Fällen war letztendlich die Explantation der Verschlussysteme die einzige verbleibende therapeutische Option (Dasika 2003, Fukahara 2003, Singh 2004). In Anbetracht der geschätzten 15% der Weltbevölkerung mit Nickel-Hypersensitivität sind diese Fallberichte als seltene Einzelreaktionen zu werten (Gordon 2009). Gerade aber für Patienten mit nachgewiesener Nickel-Hypersensitivität ist es wichtig die Verträglichkeit Nitinolhaltiger Implantate weiter zu erforschen und den Krankheitsverlauf dieser Patienten genau zu beobachten (Rigatelli 2007, Gordon 2009).

### **1.5 Ziele dieser Arbeit**

Der Verschluss von mVSDs vor allem unterhalb des Moderatorbandes stellt nach wie vor eine Herausforderung für Kinderkardiologen und Herzchirurgen dar. Interventionelle Therapieversuche werden häufig durch zu geringes Patientengewicht und schwierigen vaskulären Zugang limitiert. Chirurgisch dagegen sind die Nachteile des Einsatzes der HLM zu bedenken. Zusätzlich können tief apikal gelegene mVSDs über einen transatrialen Zugang häufig nur unzureichend eingesehen werden. Die Hybridtherapie, welche chirurgische und interventionelle Techniken kombiniert, ist ein neuer innovativer Ansatz zur optimierten Behandlung solch komplexer angeborener Herzfehler. Bei den bisher dazu verwendeten Verschlussystemen kam es allerdings immer wieder zu Komplikationen bei der korrekten Positionierung und zu Beeinträchtigung benachbarter Strukturen des Erregungsleitungssystems und der Klappenapparate durch zu große, unflexible Implantate (Bacha 2005 (B), Bacha 2007, ) Hieraus lässt sich ableiten, dass nach vielversprechenden ersten Ansätzen im Einsatz der bisherigen Hybridtherapien ein großer Bedarf an Entwicklung und Evaluation optimierter, neuartiger Hybridtechniken besteht. Ziel der hier vorliegenden Dissertationsarbeit war es das von Kozlik-Feldmann et al. 2008 entwickelte Hybridsystem zum Verschluss von mVSDs im chronischen Tierversuch zu beurteilen. Während eines Beobachtungszeitraums von drei Monaten sollten Verschlussergebnis, Herzfunktion, Belastbarkeit der Tiere mittels Herzkatheteruntersuchung, Echokardiographie, Stress-Echokardiographie und MRT-Funktionsuntersuchung nach 1 und 3 Monaten beschrieben und ausgewertet werden. Besonderes Augenmerk lag auf den anschließenden histopathologischen Untersuchungen zur Biokompatibilität des neu etablierten Patchsystems. Dies ist nach unserem Wissen eine der ersten Studien, die das histopathologische Einwachsverhalten von VSD-Polyesterpatches beschreibt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an 15 klinisch gesunden „Göttingen Minipigs“<sup>®</sup> beiderlei Geschlechts durchgeführt (Abb. 10). Diese Schweinerasse wurde 1961-1962 am Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Universität Göttingen neu gezüchtet und vereint das Erscheinungsbild des Minnesota Minischweins mit dem des vietnamesischen Hängebauchschweins (Sambraus 2001). Über eine Rückkreuzung mit dem deutschen Landschwein konnte der weiße Phänotyp gezüchtet werden. Als besonderes Merkmal findet sich bei diesen Tieren eine definierte Wachstumskurve mit einer maximalen Gewichtszunahme von 6 kg in 3 Monaten, im Gegensatz zum deutschen Landschwein, das in 3 Monaten circa 75-90 kg an Gewicht zulegt (Glodek 1981, Baumung 1983). Heute werden die Miniaturschweine von der Fa. ELLEGARD GÖTTINGEN MINIPIGS ApS, Sorø Landvej 302, Dalmose, Dänemark, speziell als Versuchstiere aufgezogen.



Abb 10: Göttingen Minipig<sup>®</sup>

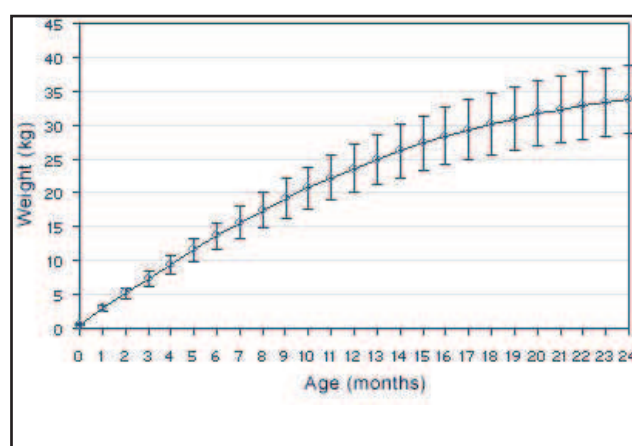


Abb.11: Wachstumskurve des Göttingen Minipigs<sup>®</sup>

Die für diese Studie verwendeten Miniaturschweine waren im Durchschnitt 8-10 Monate alt und erreichten ein Körpergewicht von 18-25kg (Abb. 11).

Im Institut für Chirurgische Forschung des Klinikums Großhadern wurden die Tiere in Tierboxen á 1,5 x 2,0m gehalten. Jeweils zu zweit in einer Box untergebracht erhielten sie Wasser ad libitum sowie ein speziell zugeschnittenes Pelletfutter (Kliba Minipig 3000, Kliba Nafag AG, Kaiseraugst, Schweiz) zweimal pro Tag. Die Stalltemperatur betrug 21°C bei einer relativen Luftfeuchte von 60-70%; die Beleuchtung war in einem 12 Stunden Rhythmus geschaltet (Dunkelphase von 18 Uhr bis 6 Uhr). Von jeder Box bestand Zugangsmöglichkeit zu einem 4,0 x 4,0m großen, nicht-überdachten Auslauf. Zwölf Stunden vor der geplanten Intervention erhielt das jeweilige Tier keine Nahrung mehr, Wasser stand ihm aber weiterhin zur freien Aufnahme zur Verfügung. Nach Versuchsabschluss erfolgte eine räumliche Trennung des frisch operierten Schweins von den noch nicht operierten Tieren in einer extra eingerichteten „Aufwachbox“.

## 2.2 VSD-Modell

Da die verwendeten Göttingen Minipigs® im Gegensatz zu den Yucatan Micropigs®, die in den USA zu ähnlichen Interventionen verwendet werden (Amin 1999 (B)) nicht von Natur aus bereits einen Ventrikelseptumdefekt besitzen (pVSDs bei den Yucatan Micropigs®), musste der mVSD hier erst manuell geschaffen werden. Das dazu notwendige Verfahren wurde in mehrmonatigen Vorversuchen etabliert (Kozlik- Feldmann 2008 (A)). Abbildung 12 zeigt das verwendete Stichinstrument, das in Zusammenarbeit mit der Firma Müller Instrumente GmbH, Tuttlingen, speziell für diese Intervention entwickelt wurde. Es besteht aus einem ca. 20 cm langen Trokar mit 7,5 mm Durchmesser, auf den eine scharf angeschliffene Hohlneedle aufgesetzt werden kann. Mit der Spitze des Trokars erfolgt zunächst die linksventrikuläre Punktion. Anschließend wird dieser zurückgezogen und das extrakardiale Ende der Hohlneedle mit einem kleinen Verschlussstopfen verschlossen. Unter leichten Drehbewegungen kann nun mit dem scharfen intrakardialen Anteil ein kreisrunder VSD aus dem Herzseptum ausgestanzt werden (siehe Abb 12, Abb. 19 und Abb. 20).



Abb. 12: Stanzgerät zur Schaffung des mVSDs (Trokar, Hohlneedle und roter Verschlussstopfen)

## 2.3 Verschlussstechnik

Zum Verschluss des Defektes in Hybridtechnik wurde von Herrn Dr. Franz Freudenthal in Zusammenarbeit mit der Firma Pfm in Köln ein gesondertes Patchsystem mit dem dazugehörigen Befestigungsgerät („Klammernahtgerät“) gefertigt. Der 0,1 mm dicke Nylon- Patch wird dabei mittels eines Nitinol-Drahtes (ebenfalls 0,1 mm) (Draht 2 in Abb. 13) auf einen 0,25 mm x 0,75 mm großen Rahmen aufgespannt. Dieser Rahmen wiederum wird aus einem zweiten Nitinol-Draht (in Abb. 13 Draht 1) gebildet. Die Umrandung des Patches sowie die beiden überstehenden Drahtenden werden dabei von einem Polyethylenschlauch (Durchmesser 1,5 mm) umhüllt, so dass aus letzteren ein etwa 30 cm langes Führungsendstück entsteht. Der Patch mitsamt dem Rahmen kann gefaltet und in eine 9F Schleuse eingebracht werden; an der gewünschten Stelle aus der Schleuse

geschoben entfaltet sich die Patchvorrichtung dank des Formgedächtnisses des Nitinols von selbst. Über Zug an Draht 2 kann der Patch nach Befestigung aus dem Rahmen gelöst werden (siehe auch Abb. 22).

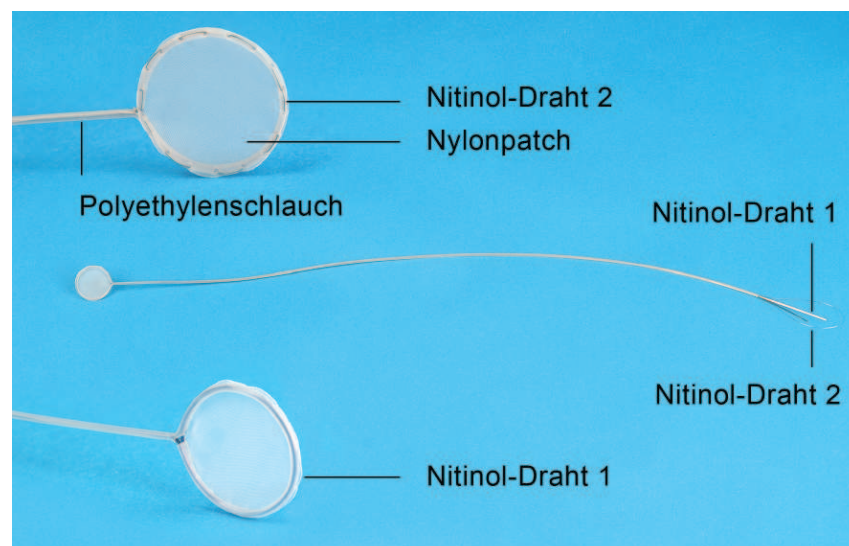


Abb. 13: Das Patchsystem

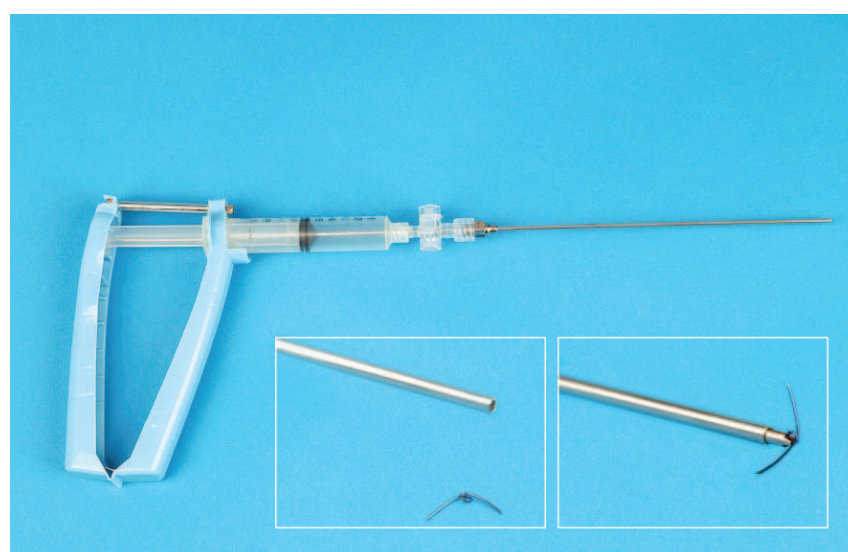


Abb. 14: Das Klammerapplikationsgerät mit Nitinolklammern

Zur Befestigung des Patches an der Herzscheidewand wurde ein staplerähnliches Nahtgerät verwendet, dessen Spitze über eine 11-F-Schleuse, über die linksventrikuläre Wand, zum Septum vorgeschoben werden kann. Die für dieses Gerät verwendeten Klammern bestehen ebenfalls aus Nitinol (Abb. 14).

## 2.4 Studiendesign

Aus den Erfahrungen der Vorversuche, bestehend aus praktischen Übungen am anatomischen Präparat (Rinderherz), Etablierung des „Defektstechens“ und des Tiermodells im Akutversuch (Kozlik-Feldmann et al. 2008 (A), 2008(B) wurde ein Protokoll zum chronischen Versuchsverlauf erstellt (Tab.2):

1. Intervention (Tag 1)	2. Intervention (Tag 30)	3. Intervention (Tag 90)
Echokardiographische Funktionsuntersuchung (FS, Klappeninsuffizienzen)	Echokardiographie s. Tag 1	Echokardiographie s. Tag 1
Rechtsherzkatheter: A. carotis /V. jugularis externa rechts (Blutgasanalyse (BGA), Hämodynamische Messungen, Ventrikulographie)	Rechtsherzkatheter: A. carotis /V. jugularis externa links	Rechtsherzkatheter: A. femoralis / V. femoralis rechts
Anterolaterale Thorakotomie	Ausleiten der Narkose und Extubation	Magnetresonanztomographie an drei ausgewählten Versuchstieren
Setzen des Defektes		Euthanasie des Tieres und Explantation des Herzens
Berechnung des Shuntvolumens (BGA, Hämodynamische Messungen)		Makroskopische Beschreibung des Herzens
Verschluss des Defektes		Pathologische Aufbereitung (Histologie, Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie)
Berechnung des Restshuntvolumens (BGA, Hämodynamische Messungen)		
Echokardiographische Funktionsuntersuchung		
Thoraxverschluss, Ausleiten der Narkose und Extubation		

Tab. 2: Protokoll des chronischen Versuchsablaufes

## 2.5 Versuchsdurchführung

### 2.5.1 Anästhesie

Dem nüchternen Versuchstier wurden zunächst intramuskulär das Neuroleptikum Azaperon (Stresnil®, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland; 2 mg/kg KG), das dissoziative Anästhetikum Ketamin (Ketamin 50 Curamed, CuraMED Pharma, Karlsruhe, Deutschland; 10-15 mg/kg KG) und das Anticholinergikum Atropin (Atropinsulfat®, Braun, Melsungen, Deutschland; 0,01 mg/kg KG) injiziert. Bei ausreichender Sedation wurde das Schwein gewogen und ein venöser Zugang zur V. auricularis lateralis gelegt, über den zusätzlich 0,1 mg/kg KG Midazolam (Dormicum, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Whylen, Schweiz) verabreicht wurden.

Im chirurgischen OP erfolgte nun die Rasur und Desinfektion der Operationsfelder (ventraler Halsbereich sowie linkslateraler Thoraxbereich) und nach einer initialen Bolusgabe des Hypnotikums Propofol (Disoprivan® 2%, AstraZeneca GmbH, Plankstadt, Deutschland; 1,5-2 mg/kg) die Intuition des Tieres (Tubus der Firma Willy RÜSCH GmbH, Kernen i. R., 6,5 mm Durchmesser). Maschinell beatmet wurde mit einem inspiratorischen Sauerstoffflow von 50% und einem positiv endexpiratorischen Druck (PEEP) von 4 mmHg (Servo Ventilator Sweden 900D, Siemens GmbH, Erlangen, Deutschland). Das Atemminutenvolumen und das Tidalvolumen wurden so eingestellt, dass in der Blutgasanalyse ein arterieller pCO<sub>2</sub> zwischen 35 und 45 mmHg gehalten werden konnte. Zur Überwachung der Beatmungssituation wurden zusätzlich in regelmäßigen Abständen auch der arterielle pO<sub>2</sub> und der pH-Wert bestimmt. Zum Schutz vor Austrocknung applizierte man dem Tier Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) unter beide Lider. Die Narkose wurde über eine Dauerinfusion Propofol (0,1 mg/kg/min) und Fentanyl (Fentanyl®, R. Janssen GmbH, Neuss, Deutschland; 1-3 mg/kg KG initial, dann 2,0 mg/kg KG/h) aufrechterhalten. Zur Flüssigkeits- substitution wurde dem Tier 50 ml/h NaCl (Natriumchlorid 0,9%, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) angereichert mit Magnesium (Magnesiocard® i.v., Vela-Pharm Arzneimittel, Tutzing, Deutschland), und bei relevantem Blutverlust Hydroxyethylstärke (Voluven® 6% HES 130/0,4, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg; frei tropfend) infundiert. Zusätzlich erfolgte zur Prophylaxe ventrikulärer Arrhythmien die kontinuierliche Gabe von Amiodaron (Cordarex®, Sanofi-Synthelabo GmbH, Berlin, Deutschland; 20 mg/kg/KG/d). Die physiologische Körpertemperatur wurde während der gesamten Intervention über eine Heizmatte aufrechterhalten und zur weiteren Kontrolle der Vitalfunktionen ein Pulsoxymeter an den Schwanz des Tieres geklemmt und ein 4-poliges EKG-Kabel angeschlossen. Oxygenierung, EKG und die Körpertemperatur wurden während der Operation konstant gemessen und aufgezeichnet (Siemens Sirecust 1281, Siemens GmbH, Erlangen, Deutschland).

Vor dem Rechtsherzkatheter über die V. jugularis externa und nach der Thorakotomie erfolgte die intravenöse Gabe von 10.000 Heparin (Heparin-Natrium Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Zur Relaxation während der Eröffnung der Brusthöhle erhielt das Schwein eine Bolusinjektion von 4 mg Pancuronium i.v. (Pancuronium-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland). Im weiteren Verlauf der Intervention wurden 50 mg Methylprednisolon gegeben (Solu-Decortin® H 50 mg, Merck Pharma GmbH, Darmstadt, Deutschland), um ein Zuschwellen des frisch gestochenen Defektes zu verhindern.

Nach erfolgreicher Intervention und Wundverschluss die Narkose ausgeleitet und das Tier bei spontaner Eigenatmung extubiert. Die postoperative analgetische Versorgung wurde über die Gabe von Buprenorphin 1x tgl. (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland 0.03-0,05 mg/kg KW i.v.) und Caprofen 2x tgl. über drei Tage (Rimadyl®, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland; 4 mg/kg KGW i.v., wenn möglich als Kautablette) sichergestellt. Zusätzlich erhielten die Tiere das Antibiotikum Enrofloxacin (Baytril® 2,5%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland; 0,2 ml/kg KG/d) bis drei Tage postoperativ und über die gesamte dreimonatige Versuchsdauer täglich 1x 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS; Aspirin®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) als antikoagulatorische Prophylaxe.

### 2.5.2 Erste Intervention (VSD und VSD-Verschluss)

#### **Bildgebung**

Die Basisuntersuchung (transthorakal) vor Beginn der Intervention wurde sowohl mit einem 2D- (Sonos 5500, Philips Medical Systems GmbH, Niederlande) als auch mit einem 3D-Ultraschallgerät (IE33 Ultrasound System, Philips Medical Systems GmbH) durchgeführt. Der Prozess des Defektsetzens und des Patchverschlusses dagegen wurde mit einer transösophagealen Echokardiographiesonde (TEE-Sonde) der Stärke 5 Mhz verfolgt. Durch eine kurze Inzision im 6. Rippenzwischenraum wurde die Sonde bis an das Herz herangeführt und unter Bildkontrolle der Hinterwand angelegt. So konnten Bildschnitte ähnlich einer transösophagealen Echokardiographie erzielt werden. Diese war hier aus technischen Gründen nicht möglich. Vor allem die Positionierung des Patches und der „Klammervorgang“ erfolgten zusätzlich unter ständiger Röntgenkontrolle. Die epikardiale (X7-2 Matrix-Transducer) 3D-Darstellung des Defektes und der Herzscheidewand nach erfolgreicher Platzierung des Patches rundeten die beständige Bildkontrolle der Intervention ab.

#### **Operative Vorbereitung**

Das Versuchstier wurde zunächst in Rückenlage gebracht und an Vorder- und Hinterläufen fixiert. Nach echokardiographischer Funktionsuntersuchung wurde der ventrale Halsbereich nochmals mit Iodlösung desinfiziert (Braunol® 7,5%, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), und mit sterilen Tüchern abgedeckt. Nun erfolgte eine etwa 3 cm lange Inzision rechts, parallel zur Trachea und die Darstellung des M. sternocleidomastoideus. Medial des Muskels war die A. carotis externa aufzufinden. In diese wurde nach Seldinger-Technik eine 9-F-Schleuse eingebracht. Die Kanülierung der V. jugularis externa lateral des Muskels erfolgte mittels einer 11-F-Schleuse (Abb. 15).



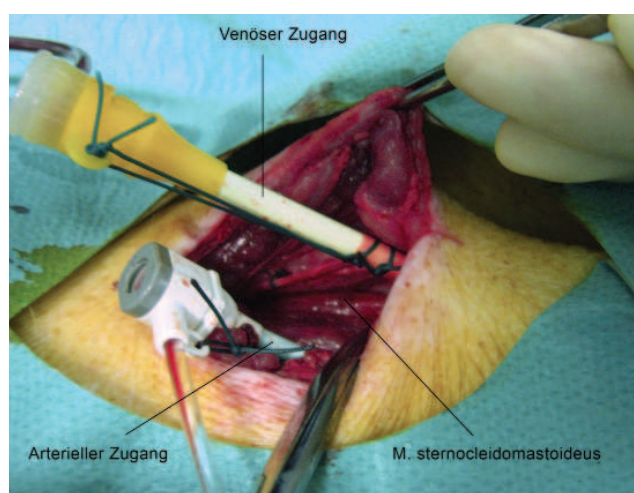


Abb. 15: Schleusenzugänge am Hals des Tieres

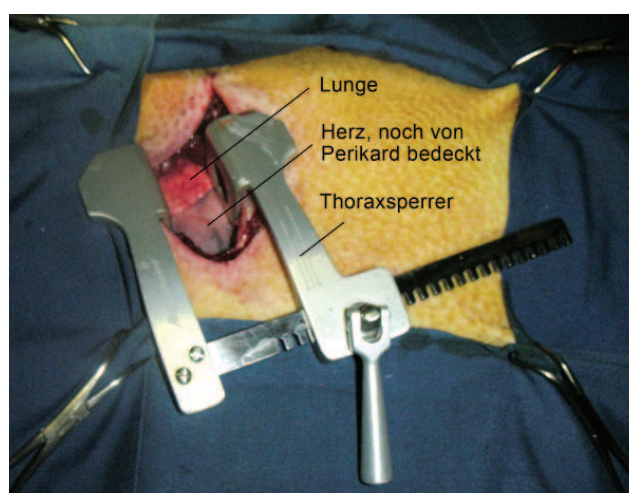


Abb. 16: Operationssitus thorakal

Die arterielle Schleuse wurde mit einem externen Druckabnehmer verbunden (Siemens Hemo 2, Siemens GmbH, Erlangen, Deutschland) und auf Herzhöhe geeicht. Am Anästhesiemonitor konnten jetzt systolische, mittlere und diastolische Blutdruckwerte abgelesen werden. In die venöse Schleuse wurde ein Swan-Ganz-Katheter eingeführt (Criti Care™ SPS 107 TD Catheter, Becton Dickinson Critical Care Systems Pte Ltd., Singapur) und ebenfalls mit einem Druckabnehmer verbunden und geeicht. Alle Schleusen, Katheter und Verbindungssysteme wurden vor dem Anschließen gründlich mit Natriumchloridlösung (NaCl) gespült um Messfehlern und Luftembolien vorzubeugen. Im Zuge der Rechtsherzkatheteruntersuchung wurden die ersten hämodynamischen Werte des zentralvenösen Druckes (ZVD), des Druckes im rechten Ventrikel (RVP), des pulmonalarteriellen Druckes (PAP), des pulmonal-kapillären Verschlussdruckes (PCWP oder Wedge-Druck) und die Ausgangswerte der Blutgase über Blutproben an den entsprechenden Katheterorten, sowie eine arteriellen Probe aus der 9-F-Schleuse, gemessen. Die vom Monitor aufgezeichneten Druckkurven und -werte wurden per Ausdruck festgehalten.

Anschließend wurde das Schwein in Rechtsseitenlage umgelagert. Auch das Operationsfeld zur Thorakotomie wurde mit Iodlösung desinfiziert und steril abgedeckt. Zur zusätzlichen Analgesie und Relaxation erhielt das Tier 0.1 mg Fentanyl und 4 mg Pancuronium. Anschließend wurde ein 10 cm langer Hautschnitt etwa zwei Finger breit distal des Schulterblattes im Rippenverlauf angebracht. Die Mm. Pectorales und Intercostales wurden ligiert, scharf durchtrennt und der 4. Rippenzwischenraum eröffnet. Nach Einsetzen des Thoraxsperrers erfolgte die Durchtrennung und Hochnaht des Perikards und damit die Freilegung des Herzens. Überstehende Lungenanteile wurden mit Kompressen zurückgedrängt. (Abb. 16)

Für die TEE-Sonde des Echokardiographiegerätes wurde nun etwa 3 cm weiter aboral der Thoraxwunde ein kleiner Zugang am Oberrand der 6. Rippe gesetzt. Hier wurde am Ende der Operation von Thoraxverschluss bis zum Erwachen des Tieres eine Thoraxdrainage eingelegt (Abb. 17).

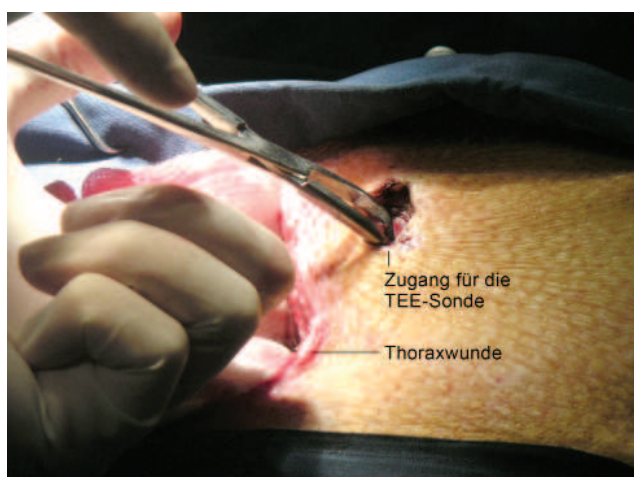


Abb. 17: TEE-Sonden- bzw. Drainagezugang

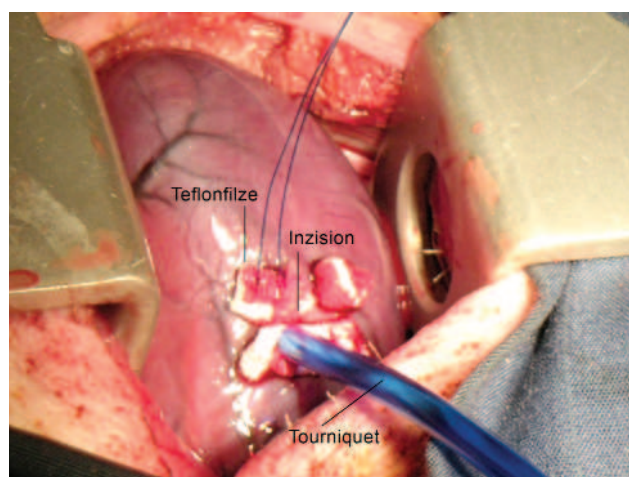


Abb. 18: Tabaksbeutelnaht am schlagenden Herzen

Sowohl als Zugang für das Stichinstrument als auch für die zum Einbringen des Klammernahtgerätes nötige 7-F-Schleuse musste die Wand des linken Ventrikels punktiert werden. Zur Sicherung der Inzision legte man zunächst an einer geeigneten Stelle zwischen den Koronarien zwei gegenläufige mit Teflonfilzen bezogene U-Nähte vor und besetzte deren Enden mittels zweier Tourniquets (Abb. 18). Anschließend wurde die ausgesuchte Punktionsstelle mit einem spitzen Skalpell eingeschnitten und das eigens für diesen Zweck entwickelte Stanzinstrument (Trokar mit Hohlnadel) angesetzt. (Abb. 19)

### Schaffung des Ventrikelseptumdefektes

Um ein zu schnelles Zuschwellen des Defektes zu vermeiden erhielt das Tier zunächst Cortison i.v. Dann wurde unter echokardiographischer Kontrolle mit dem Trokar die Wand des linken Ventrikels durchstoßen. War die Position der Sonderanfertigung echokardiographisch eingestellt wurde der Trokar aus der Hohlnadel gezogen und diese sofort mit dem Plastikstopfen verschlossen. Unter beständiger Bildgebung mittels 2D-, 3D-Echokardiographie epikardial und der TEE-Sonde hinter dem Herzen erfolgte nun mit der scharfen Hohlnadel die Durchbohrung der Herzscheidewand im muskulären Bereich. (Abb. 20)

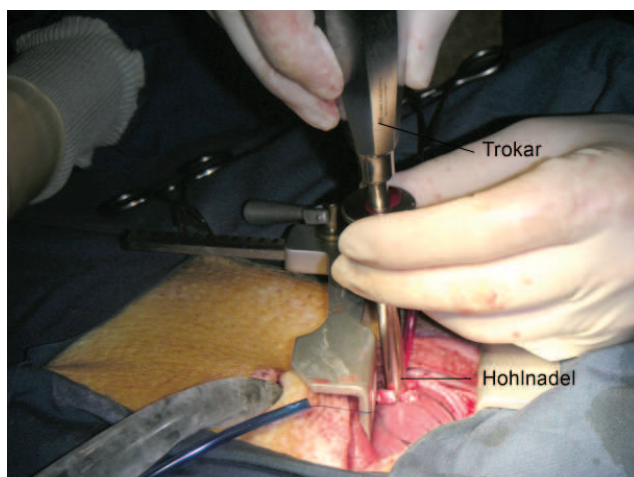


Abb. 19: Einsetzen der Sonderanfertigung zum Defektstechen

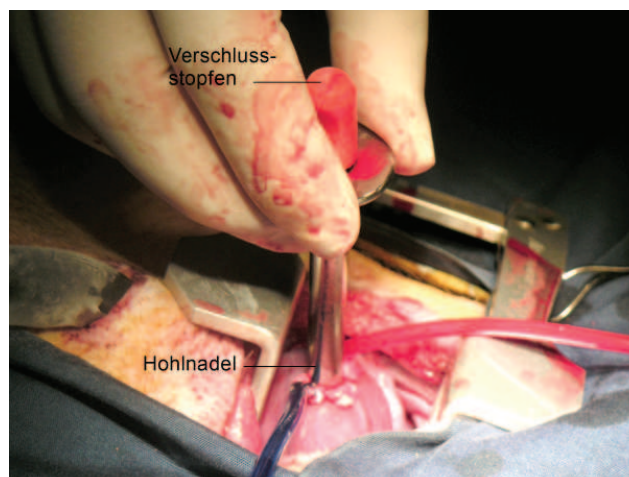


Abb. 20: Setzen des Defektes mit der Hohlnadel

Bei echokardiographisch nachweisbarem Shunt wurde nun auch die Hohlnadel langsam und unter kontinuierlichem Zug an den Tourniquets aus dem Herzen gezogen.

Alle Veränderungen der Druckkurven, der Herzfrequenz und anderer Vitalparameter des Tieres wurden während der Intervention gespeichert und zur späteren Auswertung ausgedruckt.

Zum hämodynamischen Nachweis des Shuntes erfolgte nun eine weitere Pulmonalkatheteruntersuchung mit Blutprobenentnahme und der Berechnung des Shuntvolumens nach der Fick'schen Methode.

$$Q_{\text{Shunt}} = Q_{\text{pulmonal}} - Q_{\text{systemisch}} \text{ (Link-Rechts-Shunt)}$$

Das ermittelte Shuntvolumen wurde dabei als Prozentanteil des pulmonalen Herzzeitvolumens angegeben:

$$Q_{\text{Shunt}} / Q_{\text{pulmonal}} \times 100\%$$

### Verschluss des Defektes

Die 7-F-Schleuse für das Klammernahtgerät wurde auf ca. 3 cm gekürzt und anschließend über die Tabaksbeutelnaht in der linken Ventrikelwand platziert und mit den Tourniquets fixiert. Das Patchsystem wurde nun in einen 7-F-Führungskatheter eingebracht und über die arterielle 9-F-Schleuse durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben und entfaltet. Mittels Echokardiographie bestimmte man die optimale Lage der Patches vor dem geschaffenen mVSD.

Nun konnte das Klammernahtgerät geladen und über ventrikuläre 7F-Schleuse in den Ventrikel vorgeschoben werden. (Abb. 21) Unter zusätzlicher röntgenologischer Kontrolle wurde der Patch aufgesucht.



Abb. 21: Befestigung des Patches

Dieser konnte über den langen Schaft des Gerätes exakt über dem VSD gehalten und an die Ventrikelwand gedrückt werden. Somit war eine optimale Positionierung des Patches zum kompletten Verschluss möglich. War echokardiographisch kein Shunt mehr nachweisbar erfolgte an dieser Stelle das Setzen der ersten Klammer. Mit einem vorgeladenen zweiten Gerät wurde sofort darauf die zweite Klammer eingebracht. Der Erfolg des Verschließens wurde kontinuierlich mit Hilfe der Bildgebung überwacht. Reihum werden acht bis zwölf Klammern ca. 0,5 cm ausgehend vom Rand des Patches zur Befestigung gesetzt bis der VSD komplett verschlossen war. Nun konnte über Zug am Ende des Nitinolbefestigungsdrahtes der Rahmen abgelöst und zurück in die Schleuse gezogen werden (Ex-vivo-Demonstration Abb. 22). Der Nylonflicken verblieb fixiert auf dem VSD. Die Lage wurde nochmals echokardiographisch kontrolliert.

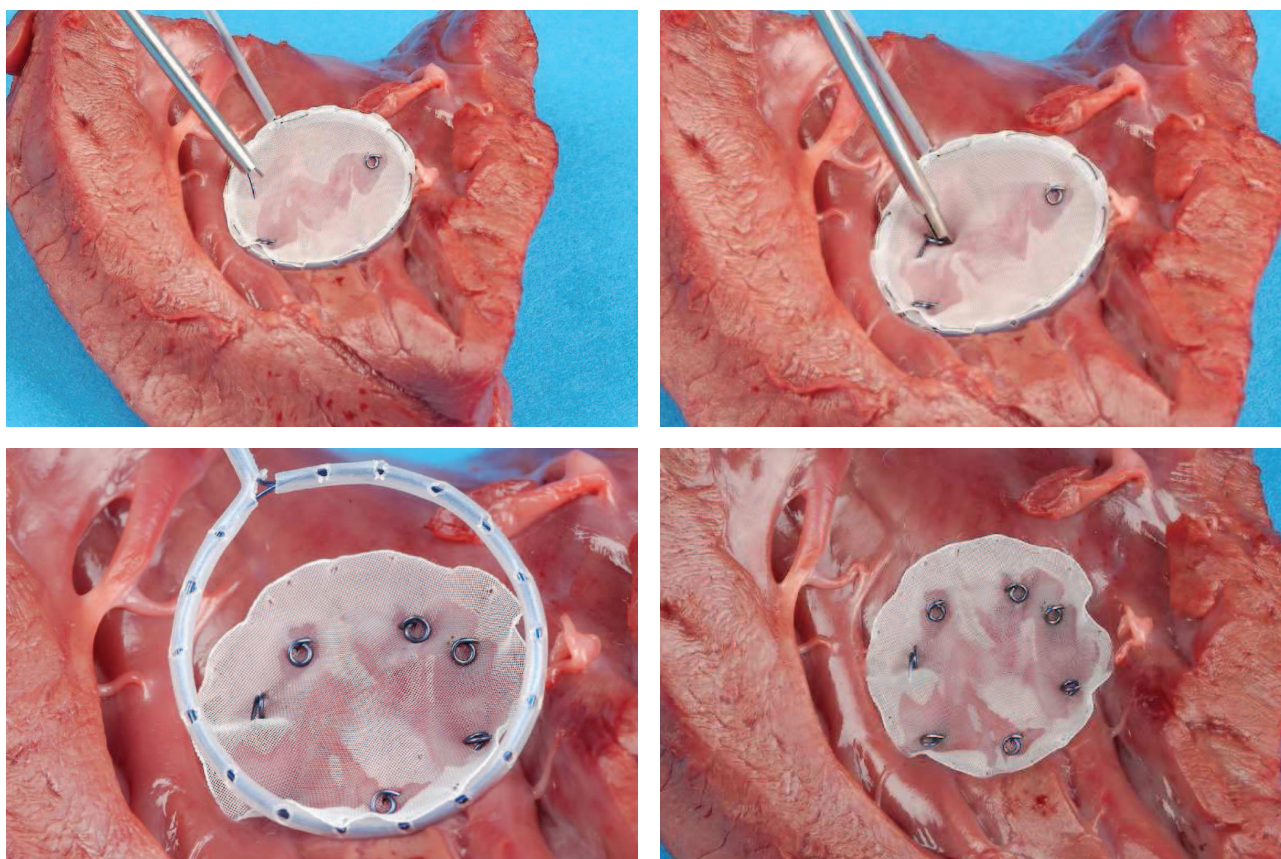


Abb. 22: Ex-vivo Demonstration der Patchfixierung mittels Nitinolklammern und Ablösen des Trägerrahmens

Um den kompletten Verschluss auch hämodynamisch nachzuweisen wurden neben der Aufzeichnung der Druckkurven wieder Blutproben entnommen und nochmals nach der Fick'schen Methode Shuntberechnungen angestellt und dokumentiert.

### **Thoraxverschluss und Übergang zur chronischen Versuchsreihe**

Nach Entfernen der ventrikulären Schleuse und Verschluss der Punktionsstelle mittels vorgelegter Tabaksbeutelnaht wurde an Stelle der TEE-Sonde ein Drainageschlauch in den offenen Herzbeutel vorgeschoben und der Operationssitus unter genauer Inspektion drainiert. Nach mehrmaligem Überblähen der Lunge wurde schließlich der Thoraxraum mittels perikostaler Einzelheften luftdicht verschlossen. Muskulatur und Subkutis wurden jeweils fortlaufend vernäht. Zum Verschluss der Haut wurde ein Hautklammergerät (Autosuture™ Royal 35W, Tyco Healthcare, Norwalk, USA) verwendet; es folgte der Wundverband mit Braunovidon®- Salbe (Povidon-Salbe, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und sterilen Kompressen.

Das Schwein wurde wieder in Rückenlage gebracht und die Katheter der Gefäße am Hals bei gleichzeitigem Abbinden mit den vorgelegten Nähten gezogen. Der Wundverschluss erfolgte mit U-Heften

und einem sterilem Verband analog der Thoraxwunde.

Nun konnte nach nochmaligem Blähen der Lunge die Thoraxdrainage gezogen werden. Über die vorgelegte U-Naht wurde ein luftdichter Verschluss erreicht. Die Ausleitung und Extubation erfolgte noch im Operationssaal. Unter stabilen Herz- Kreislaufbedingungen, ausreichender Analgesie und Antibiose wurde das Schwein in die Aufwachbox des Tierstalles gebracht und intensivst nachbetreut (Abb. 23).



Abb. 23: Erfolgreich therapiertes Versuchstier zwei Wochen postoperativ

### 2.5.3 Zweite Intervention (Nachuntersuchung)

Nach einem Zeitintervall von 30 Tagen erfolgte die erste Nachuntersuchung der Versuchstiere. Anästhesie und Narkose entsprachen dem Ablauf der 1. Intervention und auch A. carotis communis und V. jugularis externa wurden analog dem oben erläuterten Vorgehen kanüliert, es handelte sich diesmal allerdings um Zugänge an den linksseitigen Halsgefäßen. Neben einer ausführlichen echokardiographischen Funktionsdiagnostik inklusive Stressechokardiographie mit Dopamin (Dopamin Fresenius 50mg/5ml, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland; 0,5-20 mg/kg/min) wurden auch Blutgase und hämodynamische Werte ermittelt um einen eventuellen Rest-shunt auszuschließen.

Nachdem alle nötigen Daten erhoben waren, wurden entsprechend der 1. Intervention die Zugänge entfernt und die Wunde versorgt. Bei gutem Allgemeinzustand wurde das erwachende Tier wieder in den Stall zurück gebracht und nachversorgt.

### 2.5.4 Dritte Intervention (Abschlussuntersuchung)

Nach 90 Tagen folgte die Abschlussuntersuchung der Schweine. Auch hier galten die gleichen Schemata für Anästhesie und Narkose; die Katheterzugänge wurden an Arteria und Vena femoralis gelegt. Dazu wurde der M. rectus femoris am proximalen linken Oberschenkel aufgesucht und Arterie und Vene, medial davon verlaufend, dargestellt und nach Seldinger punktiert. Der kleinere Durchmesser der Leistengefäße erforderte dabei die Einlage zweier 7-F-Schleusen anstatt der kraniellen 9- und 11-F.

Auch diesmal wurde umfassend auf echokardiographisch erfassbare Klappenvitien, Dyskinesien der Herzmuskulatur, auch unter Stress, und auf Shuntzeichen geachtet. Nach letzteren wurde auch in hämodynamischer Diagnostik und der Blutgasanalyse geforscht. Bei drei ausgewählten Versuchstieren erfolgte zusätzlich eine Funktionsuntersuchung im MRT.

Waren alle Daten ermittelt wurde im Operationssaal der Thorax nochmals eröffnet und das Tier mittels intravasaler Kaliumgaben (1M-Kaliumchlorid-Lösung, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland; 40 mval) getötet. Nach Explantation des Herzens folgte die sofortige makroskopische Beschreibung des Präparates von außen und mit Blick auf das Septum und den applizierten Patch. Dann wurde ein Ausschnitt aus dem Patchbereich des Präparates für histologische und immunhistochemische Untersuchungen in Formaldehyd (gepuffert 4%) eingelegt, ein anderer Ausschnitt in Glutaraldehyd (2,5%) zur Elektronenmikroskopie.

## 2.6 Untersuchte Parameter

### 2.6.1 Echokardiographie

Zur präinterventionellen morphologischen und funktionellen Untersuchung wurden gemäß echokardiographischer Standards Schnitte in parasternaler langer und kurzer Achse und im apikalen Vier- und Zweikammerblick durchgeführt. In den entsprechenden Ebenen wurde mittels Farbdoppler die Klappendichtigkeit geprüft. Im M-Mode ließ sich in parasternaler langer Achse apikal, im späteren Patchbereich und basal der endsystolische (LVES) und enddiastolische Diameter (LVED) des linken Ventrikels ermitteln, aus dem die Verkürzungsfraction („fractional shortening“, FS) zur Abschätzung der globalen LV-Funktion berechnet werden kann:

$$FS = (LVED - LVES) / LVED \times 100\%$$

In Nachuntersuchung und Abschlussuntersuchung wurde die Verkürzungsfraction zur Verlaufskontrolle zusätzlich unter pharmakologischem Stress (Dopamin 0,5-20 mg/kg/min) geprüft. Die TEE-Sonde dagegen wurde während des Defektverschlusses weniger zur funktionellen sondern zur bildgebenden Überwachung der Intervention eingesetzt. Durch die direkte Lage apikal hinter dem Herzen konnte ein Schnitt im Sinne der langen Achse eingestellt werden, in dem das Herzseptum gut zu beobachten war. So konnte das Defektstechen

kontrolliert werden, das morphologische Korrelat und die Größe des entstandenen Shunts über den Farbdoppler sichtbar gemacht und gemessen werden und besonders auch der Kompletverschluss des Defektes bestätigt werden. Neben der kontinuierlichen Darstellung über die TEE-Sonde wurde zusätzlich abschnittsweise ein epikardiales 2D- und 3D-Bild aufgenommen um den Septumdefekt und den Zustand nach Verschluss besser räumlich darzustellen und damit das Endergebnis optimieren zu können.

### 2.6.2 Magnetresonanztomographie

An drei zufällig ausgewählten Tieren wurde exemplarisch nach der 3. Intervention unter bestehender Vollnarkose und manueller Beatmung eine MRT-Untersuchung (1,5 Tesla Magnetom Avanto, Siemens Health Care, Erlangen) durchgeführt. Mit Cine-SSFP-Sequenzen (räumlich Auflösung  $1,6 \times 1,2 \times 3 \text{ mm}^3$ ) wurden bei jedem Tier unter Atemanhaltetechnik eine Übersichtsaufnahme, ein Referenzscan, Aufnahmen im 2-, 3- und 4- Kammerblick und ein doppelt angulierter Kurzachsenschnitt durchgeführt. Diese Aufnahmen ermöglichten Vorhof- und Ventrikelvolumetrie, Muskelmassenbestimmungen, eine qualitative Bestimmung der Ventrikelfunktion sowie die Beurteilung der Septumkinetik während des gesamten Herzzyklus. 10 Minuten nach einer gadoliniumhaltigen Kontrastmittelinjektion (0,2 mmol/kg KG, Magnevist BayerSchering Pharma, Berlin) wurden die Bilder im Sinne der „Delayed Contrast Enhancement“-Methode („Inversion Recovery“ (IR) TurboFLASH, räumliche Auflösung  $1,6 \times 1,2 \times 5 \text{ mm}^3$ ), wiederholt. In T1-gewichteter Bildgebung konnte hier die Myokardvitalität beurteilt werden. Myokardareale, die in der Spätphase der Injektion (nach 5- 15 min.) mit einer Anreicherung des extrazellulären Kontrastmittels reagieren (sog. „delayed enhancement“ Kim 1999, Rehwald 2002, Foo 2005), entsprechen irreversibel geschädigten (infarzierten) Myozyten bzw. Gewebeveränderungen wie z.B. fokalen Fibroseherden (Prakasch 2004). Die Zellmembran intakter Myozyten ist dagegen nicht permeabel (Hunold 2007). Die Vitalitätsdiagnostik erlaubt so schon kurz nach Korrektur des VSDs eine erste Evaluation der chirurgischen oder interventionellen Therapie.

Die Analyse der Bilder erfolgte parallel auf einer View Forum Workstation (Philips Medical Systems, Best, Niederlande).

### 2.6.3 Hämodynamik

Die zur hämodynamischen Beschreibung des Shuntverhaltens wichtigen Druckkurven und -werte wurden invasiv mit externen Druckwandlern gemessen. Diese sind mit dem Anästhesiemonitor verbunden, an dem der Kurvenverlauf und die ermittelten systolischen, mittleren und diastolischen Werte abgelesen werden konnten. Vor Beginn der Messungen wurde der Druckwandler in Herzhöhe auf 0 geeicht. Die Druckwerte wurden in der Einheit mmHg angegeben.



Über die kanülierte A. carotis externa konnte kontinuierlich der systolische, mittlere und diastolische systemische Blutdruck ermittelt werden (APsyst, APdiast, MAP). Besonderer Wert wurde hier auf die genaue Erfassung der Werte zu Beginn, nach Setzen des Defektes und nach Verschluss des Defektes gelegt. Zur Evaluierung der Reaktion des Tieres auf die Manipulation am schlagenden Herzen (Vorlegen der Tabaksbeutelnaht bis Herausziehen des Patchrahmens) erfolgte auch hier eine genaue Speicherung der Werte in kurzen Abständen. Gleiches galt für die über den Swan-Ganz-Katheter ermittelten Druckwerte im rechten Herzen (ZVD, RVP, PAP, PCWP). In den Nachuntersuchungen war hierbei vor allem die Entwicklung des pulmonalarteriellen Druckes von besonderem Interesse, um die Wirkung des Defektes auf den kleinen Kreislauf und die linksventrikuläre Funktion einschätzen zu können.

## 2.6.4 Histologische Aufarbeitung

### Makroskopische Evaluierung

Die explantierten Herzen wurden zunächst rein äußerlich in Größe und Colorit beschrieben. Nach Eröffnung beider Ventrikel folgte eine vorsichtige Spülung mit NaCl bei Beachtung eventueller Thrombosierungsherde und eine erste Beurteilung des Klappenapparates und des Herzseptums. Die Lage des linksventrikulären Zuganges in Bezug auf den Defekt, sowie die Position des Defekts im Septum selbst wurden analysiert und danach auf den Sitz, Anzahl und Einwachsverhalten der Nitinolklammern eingegangen. Zuletzt folgte die Begutachtung der Position des Patches und auch dessen Einwachsens und Endothelialisierung.

### Histopathologie

Die histopathologische Aufarbeitung der Präparate wurde von den Kooperationspartnern der Kinderherzklinik Göttingen durchgeführt (federführend Herr Dr. Matthias Sigler), die jahrelange Erfahrung mit Biokompatibilitätsuntersuchungen kardiovaskulärer Implantate bieten.

Nach der makroskopischen Beurteilung durch unsere Arbeitsgruppe wurde ein Teil des Patches mit anhängender Septummuskulatur als Gewebeprobe für die Histologie aus den Herzen entnommen, in 4%-igem PBS-gepufferten Formmaldehyd fixiert und nach Göttingen versandt. Nach mindestens 24 Stunden Fixationszeit und Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol wurden die Proben in Methylmethacrylat eingebettet (Technovit 9100, Kulzer & Co, Wehrheim, Deutschland). In konventioneller Paraffin-Einbettung wäre eine Beurteilung der Reaktion zwischen Metall und Gewebe nicht möglich gewesen (Sigler 2007). Nach der Aushärtung über 48 Stunden bei -4 bis -2 °C wurden von diesen Kunstharzblöcken mit einer Diamantsäge 0,8 mm dünne Serienschnitte erstellt, die nach horizontalem Schleifen am Mikrotom zu 5- 30µm Dicke (400 CS, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt) mittels Polymerkleber auf Kunststoff-Objektträger fixiert wurden. Die Färbung der histologischen Präparate erfolgte zur konventionellen histologischen Untersuchung mit Richardson-Blau. Die dafür erforderliche Färbelösung enthielt Methylenblau, Natriumtetraborat (Borax)

und Aqua dest., sowie Azur II und Aqua dest.. Die Präparate wurden für 24 h in der Färbelösung inkubiert. Basophile Strukturen wie Zellkerne färbten sich blau, metachromatische Strukturen rotviolett.

### 2.6.5 Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie

Mittels immunhistochemischer Färbung lassen sich antigene Zielstrukturen (hier Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen der neu einsprossenden Gefäße) mit großer Sensitivität und Spezifität nachweisen. Die Anfärbung der Gewebeschnitte erfolgte hierbei nach der so genannten ABC-Methode (Avidin-Biotin-Enzymkomplex-Methode, Abb. 24). Zunächst wird ein Primärantikörper, der speziell gegen die gesuchte Struktur gerichtet ist, auf das vorbehandelte Präparat aufgetragen. Nach kurzer Inkubation wird ein Sekundärantikörper dazugegeben, der gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist und an dieser Stelle bindet. Der Sekundärantikörper ist dabei mit vier Biotin-Molekülen konjugiert. Als nächstes fügt man einen Enzymkomplex hinzu, der neben einem ebenfalls Biotin-tragenden Enzym auch das Molekül „Avidin“ enthält. Dieses Eiweissglykoprotein hat die Fähigkeit vier Moleküle Biotin zu binden. Im Zuge der Komplexreaktion verbindet nun Avidin den biotinylierten Sekundärantikörper mit dem biotinylierten Enzym. Gibt man nun das entsprechende Enzymsubstrat zu kommt es nach enzymatischer Umsetzung zu einer Farbreaktion an den antikörpermarkierten Gewebeanteilen (Lang 2006).

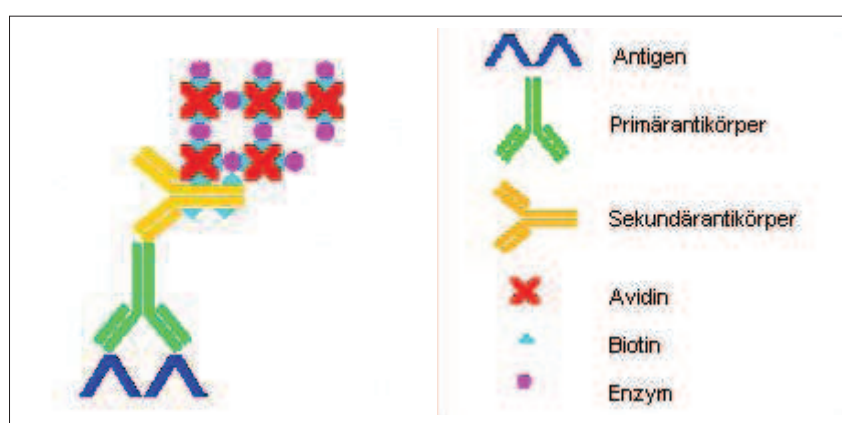


Abb. 24: Darstellung der Avidin-Biotin-Enzymkomplex-Methode (ABC-Methode) zur immunhistochemischen Färbung der Präparate

Die in dieser Versuchsreihe verwendeten Antikörper richteten sich zum einen gegen „smooth muscle actin“ (SMA) zur Darstellung glatter Muskelzellen neu einsprossender Gefäße, gegen Vimentin zum Nachweis von Endothelzellen und Fibroblasten auf dem Kunststoffpatch und gegen von-Willebrand-Faktor ebenfalls als Marker des Endothels und der Revaskularisierung.

Entsprechend standardisierter Protokolle wurde zu jeder Färbung sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle angefertigt. Erstere zum Nachweis des Färbeerfolges, letztere zum Nachweis der spezifischen Anfärbung der gesuchten Zellen.

### **Anti-Smooth-Muscle-Actin (SMA)**

Die gegen die -Smooth-Muscle-Isoform von Aktin (SMA) gerichteten Antikörper (Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4 DAKO M0851 und Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin DAKO P0260) reagierten speziell mit den glatten Muskelzellen von Arterien und Arteriolen. Herzmuskelzellen werden nicht markiert. Die Serienschnitte wurden auch hier nach einer erst kürzlich publizierten Methode deplastifiziert (Quentin 2008). Das zu untersuchende Gewebe wurde zunächst mittels eines silikonhaltigen Klebers auf dem Objektträger fixiert. Anschließend konnte die chemische Deplastifikation mit Xylene/2-Methoxyethylacetat erfolgen ohne gleichzeitig das Präparatgewebe mit abzulösen. Anschließend wurde die endogene Peroxidase 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 200 ml Methanol und 6 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert. Nach Spülgängen in Aqua dest. und TRIS-Puffer folgte die Antigendemaskierung durch Behandlung mit Pepsinlösung (500 mg Pepsin und 1 ml 2 M HCl in 200 ml warmem Aqua dest.) für eine Minute. Wiederum wurde in Aqua dest. und TRIS-Puffer gespült. Zur Blockierung unspezifischer Hintergrundfärbung wurde je 100 µl Kaninchenserumlösung (Normal Rabbit Serum), 1:10 mit TRIS-BSA-Puffer verdünnt, für 10 Minuten bei 37° C auf die Objektträger aufgetragen. Bei den Versuchspräparaten sowie bei den Positivkontrollen wurde nach Abklopfen des Serums 100 µl des 1:200 mit TRIS-BSA-Puffer verdünnten Primärantikörpers für 30 Minuten bei 37° C aufgebracht. Bei den Negativkontrollen entfiel dieser Schritt, das Serum verblieb anstelle des Primärantikörpers auf den Schnitten. Nach Abspülen des überschüssigen Primärantikörpers in TRIS-Puffer wurden je 100 µl der Lösung mit dem biotinylierten Kaninchen-Anti-Maus-Brückenantikörper, in einer Verdünnung von 1:300 mit TRIS-BSAPuffer, bei 37° C für 30 Minuten aufgetragen. Erneut wurden die Objektträger in TRIS-Puffer gespült. Bei dem verwendeten Avidin-Biotin-Enzymkomplex (StreptABComplex/HRP) wurde Horse Radish Peroxidase (HRP) eingesetzt. Je 100 µl des 1: 100 mit TRIS-BSA-Puffer verdünnten Komplexes wurden für 30 Minuten bei 37° C auf die Objektträger aufgebracht, anschließend wurden die Präparate noch einmal in TRIS-Puffer gespült, dann folgte die Farbentwicklung mit dem Farbstoff DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochloride Dihydrat p.a.) für 20 Sekunden. Gestoppt wurde die Reaktion mit Aqua dest.

Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Präparate dehydriert und auf Objektträger gezogen. Arteriolen sind so an ihrer braun gefärbten glatten Muskelzellschicht zu erkennen (Abb. 37).

### **Anti-Vimentin**

Dieser Antikörper (Mouse Anti-Vimentin Clone V9 DAKO M0725, Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin DAKO P0260) ist speziell gegen das Intermediärfilament Vimentin gerichtet, das in allen Zellen mesenchymalen Ursprungs (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Bindegewebe, Fibroblasten, Zellen des lymphatischen und hämatopoetischen Systems u.a.) nachgewiesen werden kann.

Das hier verwendete Färbeprotokoll entsprach im wesentlichen dem des SMA-Antikörpers.

### **Anti-von-Willebrand-Faktor (vWF)**

Der Von-Willebrand-Faktor (Faktor-VIII-assoziiertes Antigen) stellt einerseits einen Cofaktor der Blutgerinnung dar, findet sich aber auch in Endothelzellen und gilt als wichtiger Marker dieser Zellen in der Immunhistochemie.

Auch hier entsprach das Färbeprotokoll weitgehend dem weiter oben genannten.

### **Elektronenmikroskopie**

Die in Glutaraldehyd (2,5%) eingelegten Gewebeausschnitte aus dem Patchbereich wurden mit 0,1 molarem Na-Cacodylatpuffer (pH 7,2 – 7,4) gewaschen und in aufsteigender Acetonreihe entwässert. Entsprechend der „Critical-Point-Drying“ Methode wurden die Schnitte nun in der Druckkammer durch Auswaschung und anschließender Verdampfung von flüssigem Kohlendioxid getrocknet. Nach Montage auf den entsprechenden Probenhaltern erfolgt die Goldbeschichtung der Präparate („sputter coating“).

Unter dem Elektronenmikroskop (Zeiss DSM 940, Oberkochen, Deutschland) konnten nun die Struktur der Endothelialisierung genauestens untersucht werden.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die rechnerische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms Sigma-Plot, Version 10.0 für Windows. Zum Vergleich der Ergebnisse innerhalb der Versuchsgruppe wurde dabei der gepaarte T-Test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  angenommen. Alle angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwert (mean)  $\pm$  Standardabweichung (SD). Die statistische Auswertung wurde mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie des Klinikums Großhadern durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 VSD-Modell

Ein muskulärer Ventrikelseptumdefekt konnte in 12 von 13 (92,3%) Tieren erfolgreich gesetzt werden. Der echokardiographisch ausgemessene mittlere Durchmesser der VSDs betrug  $5,0 \pm 0,8$  mm. Der nach der Fick'schen Methode berechnete LRS lag zwischen 12,8 und 54,2 % (Mittelwert 20,1%). Die genaue Lokalisation wurde bereits in den echokardiographischen und MRT-Untersuchungen bestimmt, nach Explantation der Herzen am Ende der Versuchsreihe aber nochmals genauestens untersucht. Die gesetzten Defekte fanden sich sowohl apikal ( $n = 3$ ), midmuskulär ( $n = 6$ ), anterior- ( $n = 2$ ) als auch Inlet-muskulär ( $n = 1$ ) (Tab. 4). Ein Tier verstarb direkt nach Schaffung des mVSDs unter hämodynamischer Dekompensation.

#### 3.2 Patchverschluss des mVSDs

Komplett verschlossen werden kann der Defekt in 10 von 12 Tieren (83,3%). Der Vergleich der oxymetrischen Parameter vor und nach Verschluss zeigt ein signifikantes Absinken des LRS (Tab. 3).

Zeitpunkt der Messung	Anzahl (n)	Durchschnittlicher LRS (%)
Vor Verschluss	10	$27,9 \pm 21,3$
Nach Verschluss	10	$2,9 \pm 4,5$
	$t = 3,4$	$p = 0,0119^*$

Tab. 3: Vergleich der Shuntgrößen vor und nach Patchverschluss des VSDs (\*,signifikant)

Die Anzahl der zur ausreichenden Fixierung des Patches verwendeten Klammern liegt bei  $11 \pm 3$ . Die mittlere Durchleuchtungszeit beträgt  $25,7 \pm 9,1$  min.

Bei einem Tier gelingt es auch nach mehrmaligem Wechsel der Einführungshilfen, des Patchsystems und Positionsänderung der Bildgebung nicht, den Dacronpatch direkt auf dem induzierten VSD zu platzieren. Das Verschlusssystem schiebt sich während des Befestigungsversuchs direkt in den VSD-Kanal und verschließt diesen damit nicht adäquat. Zusätzlich werden die Sehnenfäden und der Papillarmuskel der Trikuspidalklappe mit zwei Klammern verletzt, so dass diese Intervention abgebrochen und als Fehlversuch gewertet werden muss.

Bei einem weiteren Tier kann der Verschluss durch zu großen Blutverlust über die inadäquat befestigte Myo-

kard-Schleuse nicht mehr erfolgreich abgeschlossen werden. Am explantierten Herzen findet sich der Nylon-patch jedoch korrekt über dem induzierten VSD platziert und gilt damit als erfolgreich verschlossen. Eine Übersicht zeigt Tab. 4:

Tier-Nr.	Lage und Durchmesser des VSDs	Erfolg der Verschluss-technik	Komplikationen der Akutphase	Komplikationen im follow-up
1	Midmuskulär, 4,6 mm	*	°	°
2	Inlet-muskulär, 3,2 mm	Fehlversuch	Patch disloziert in den VSD-Kanal, Nitinolklammern verletzen Sehnenfäden der TK	†
3	Anterior-muskulär, 5,8 mm	*	°	°
4	Midmuskulär, 4,8 mm	*	†	Lungenödem 6Std. postoperativ
5	Apikal, 5,4 mm	*	Embolisation zweier Klammern in die Lunge	°
6	Apikal, 5,4 mm	*	°	°
7	Apikal, 5,0 mm	*	°	°
8	Midmuskulär, 5,8 mm	*	°	°
9	Anterior-muskulär, 4,7 mm	Fehlversuch	†	Tod 3 Tage postoperativ, Destruktion der TK
10	Midmuskulär, 4,2 mm	*	Iatrogene Blutung an der LV-Incisionsstelle mit hämodynamischer Dekompensation	†
11	Midmuskulär, 5,8 mm	*	°	°
12	Midmuskulär, 5,3 mm	*	†	Pneumothorax 14 Tage postoperativ
			10/12	7/10

Tab. 4: Individueller Verlauf der einzelnen VSD-Modelle (\*: erfolgreicher Verschluss des Defektes; °: Tier durchlief alle Versuchsphasen; †: Tier verstarb vorzeitig)

### 3.3 Follow-up

Von den zehn Versuchstieren mit verschlossenem VSD kann an sieben (70,0%) die Nachuntersuchung nach vier Wochen und die Abschlussuntersuchung nach zwölf Wochen durchgeführt werden (siehe Tab. 5). Von den drei Tieren, die die chronische Phase der Versuchsreihe nicht vollständig durchlaufen verstarbt eines an einer Komplikation der Patchtechnik. Hier zeigt sich zwölf Tage nach Intervention bei der makroskopischen Aufarbeitung des explantierten Herzens, dass ein Sehnenfaden der Trikuspidalklappe von zwei Nitinolklammern am Septum fixiert worden war. Auch dieses Tier wird als direkter Fehlversuch gewertet.

Das vorzeitige Versterben der weiteren zwei Tiere während der chronischen Phase lässt sich hingegen auf perioperative Komplikationen zurückführen, die nicht in direktem Zusammenhang mit der Implantationstechnik stehen. So verstarbt Tier 4 sechs Stunden bei anatomisch korrekter Lage des Patches und erfolgreichem Shuntverschluss an einem akuten Lungenödem. Tier 12 erleidet zwei Wochen nach Intervention ohne klare Ursache einen Pneumothorax und muss euthanasiert werden.

Alle anderen Tiere (n = 7) können nach kurzer Zeit in der Aufwachbox ohne Probleme zu ihren Gefährten entlassen werden. Thrombembolische Komplikationen durch das eingebrachte Fremdmaterial werden im dreimonatigen Verlauf nicht beobachtet. Bei Tier 5 finden sich allerdings in der Nachuntersuchung unter röntgenologischer Kontrollaufnahme zwei fest verankerte Nitinolspangen im linken oberen Lungenlappen. Das Tier war bis zu diesem Zeitpunkt klinisch unauffällig und konnte unter strenger Kontrolle auch den gesamten weiteren Versuchszeitraum durchlaufen. Der bis dahin verwendete Applikator wurde daraufhin für alle nachfolgenden Tiere mit einem neuen zweistufigen Freisetzungsmechanismus ausgestattet, der ein kontrollierteres Ablösen der Klammern erlaubt. In den weiteren Interventionen konnte so eine Embolisation erfolgreich vermieden werden (siehe Tab.5).

### 3.4 Echokardiographische Parameter

Bei allen Versuchstieren kann in der präinterventionellen Ultraschalluntersuchung ein vorbestehender VSD ausgeschlossen werden. Lediglich ein Tier zeigt einen 3-4mm durchmessenden ASD vom Secundum-Typ, ein anderes eine bikuspidale Aortenklappe. Andere morphologische Veränderungen der Herzen sind nicht festzustellen.

In den Nachuntersuchungen finden sich zumeist geringgradige Klappeninsuffizienzen (1.Grades), die aber bis zu den Abschlussuntersuchungen deutlich rückläufig sind (Tab. 5).



Tier-Nr.	Morphologische Echokardiographie		
	Lage und Durchmesser des VSDs	Erfolg der Verschlusstechnik	Komplikationen der Akutphase
1	TI°I	TI °I-II; AI °I; §	TI °-II; AI °I, §
2	‡	-	-
3	‡	TI °II; MI °I; trivialer Restshunt	TI°II; trivialer Restshunt
4	‡	-	-
5	‡	TI°I; MI°I; §	TI°I; §
6	Bikuspide Aortenklappe	TI°I; MI°I; AI °I; §	PI°III, §
7	AI I°	TI°I; MI°I; AI°I; PI I°, §	TI I°, §
8	‡	TI°I; §	TI°I; PI °I, §
9	ASD 3-4 mm	-	-
10	‡	-	-
11	‡	TI I°, AI I°; §	TI I°, AI I°, MI I°; §
12	‡	-	-

Tab. 5: §, Kein Restshunt; ‡, keine Pathologie; TI, Trikuspidalklappeninsuffizienz; MI, Mitralklappeninsuffizienz; AI, Aortenklappeninsuffizienz; PI, Pulmonalklappeninsuffizienz

Um den Verlauf der Defektheilung und die Auswirkungen auf die Funktion des LV bestimmen zu können wird neben der morphologischen Untersuchung auch eine funktionelle mittels Bestimmung der Verkürzungsfraktion („Fractional Shortening“ = FS) durchgeführt. In Ruhe hielten sich diese Werte global mit  $40,8 \pm 5,0\%$  bei der Basisuntersuchung,  $42,8 \pm 4,1\%$  bei der Nachuntersuchung und  $41,9 \pm 6,5\%$  bei der Abschlussuntersuchung während des gesamten Beobachtungszeitraumes bei allen Tieren weitgehend konstant. Auch in der Stressechokardiographie zeigt sich eine gleich bleibend gute linksventrikuläre Funktion mit FS Werten um  $50,0 \pm 9,2\%$ . Bei spezifischerer Messung im Patchbereich findet sich jedoch bei 3 von 7 Tieren eine im Vergleich zu apikalem und basalem Septum leicht abgeschwächte Kontraktionsfähigkeit (Tab. 6).

Messpunkt	FS unter Stress NU in %	FS unter Stress AU in %
Basal	44,8 ± 16,8	46,8 ± 10,1
Patchbereich	60,2 ± 0	49,2 ± 17,6
Apikal	75,8 ± 0	65,3 ± 7,0

Tab. 6: „Fractional-Shortening“ (FS) unter Dobutamin während der Nachuntersuchung (NU) und Abschlussekardiographie (AU).

### 3.5 Magnetresonanztomographie

Diese Befunde lassen sich auch in der bei drei Tieren durchgeführten MRT-Untersuchung bestätigen. Bei unauffälligen globalen Funktionsparametern zeigt sich systolisch eine fokal disharmonische Myokardverdickung im Patchbereich (Abb. 25: Weißer Pfeil Bild B). Die Nitinolklammern verursachen kleine Suszeptibilitätsartefakte.

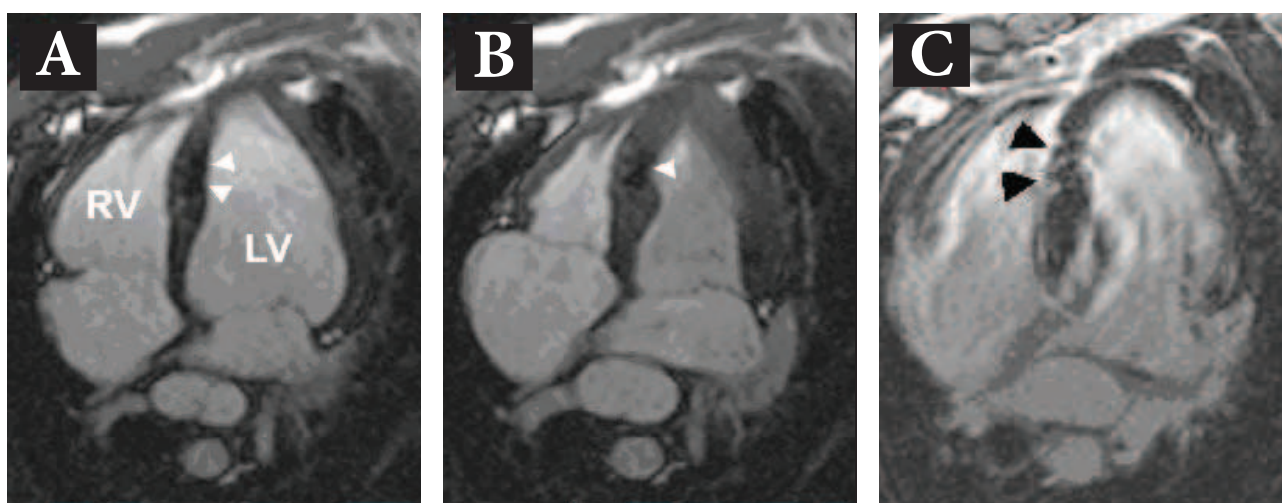


Abb. 25: SSFP-Cine-MRT-Untersuchung zur Evaluation der Myokardkontraktion in Diastole (A) und Systole (B), die weißen Pfeile kennzeichnen den Patchbereich; C: Contrast-Enhanced-MRT-Untersuchung zur Vitalitätsdiagnostik, die schwarzen Pfeile kennzeichnen die fleckige Kontrastmittelanreicherung („patchy enhancement“) im Patchbereich.

In den Vitalitätsuntersuchungen mit Gadolinium haltigem Kontrastmittel fallen in der Spätphase der T1-Wichtung kleinfleckige Anreicherungen („patchy enhancement“) im Bereich des ehemaligen VSDs auf (Abb. 25: Schwarze Pfeile Bild C). Ein ähnlicher Befund zeigt sich an der ehemaligen Ventrikulotomiestelle, die als kleine fibrotische Narbe imponiert.

### 3.6 Hämodynamische Parameter

#### 3.6.1 Mittlerer arterieller Druck, systemischer und diastolischer Blutdruck im Versuchsverlauf

Bei stabilen Kreislaufverhältnissen zeigt sich zunächst bei allen Tieren ein deutliches Absinken der arteriellen Blutdrücke mit Beginn der Thorakotomie. Der hämodynamisch kritische Punkt liegt im Zeitintervall während bzw. kurz nach dem Defektstechen (siehe Abb. 26).

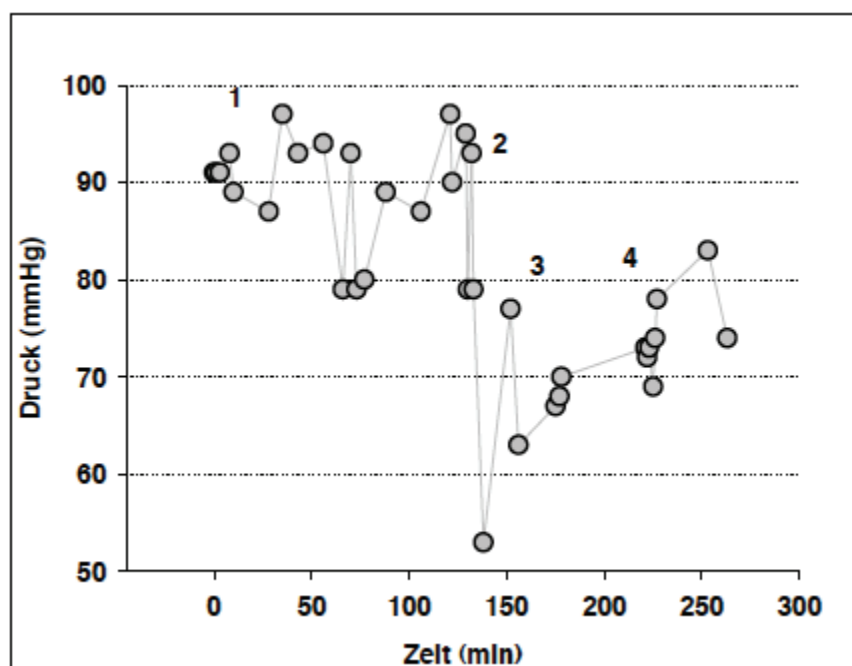


Abb.26: Mittlerer arterieller Blutdruck der Tiere während des Eingriffs: 1 = Basismessung, Hautschnitt; 2 = Stanzen des Ventrikelseptumdefektes; 3 = Positionierung des Patchsystems; 4 = Fixierung des Patchsystems mit Nitinolklammern.

Hier kommt es zu einem akuten Abfall des systemischen Blutdrucks unter 60 mmHg. Lediglich bei einem Tier müssen die fallenden Druckwerte durch katecholaminerge Unterstützung aufgefangen werden. Alle anderen Tiere halten sich nach Schaffung des Defektes auf einem stabilem hämodynamischen Niveau und erholen sich nach Defektverschluss zusehends.

### 3.6.2 Pulmonal-arterieller Druck und pulmonal-kapillärer Verschlussdruck

Nach Setzen des Defektes ergibt sich eine signifikante Zunahme der pulmonal-arteriellen Druckwerte von  $17,7 \pm 4,3$  auf  $27,7 \pm 2,9$  mmHg. Auch der pulmonal-kapilläre Verschlussdruck als Spiegel der linksatrialen Druckverhältnisse steigt deutlich an. Der Verschluss dieses Shunters resultiert in einer kontinuierlichen Verringerung der Lungendruckwerte in Richtung des Ausgangsniveaus (Tab. 7).

Parameter	Basismessung	Nach Schaffung des mVSD	Nach Verschluss des mVSD
MAD (mmHg)	$77,8 \pm 11,1$	$60,4 \pm 12,4$	$67,2 \pm 8,8$
ZVD (mmHg)	$7,4 \pm 2,6$	$9,1 \pm 3,6$	$8,1 \pm 3,4$
PAP syst. (mmHg)	$17,7 \pm 4,3$	$27,7 \pm 2,9$	$23,1 \pm 4,1$
PCWP (mmHg)	$10,3 \pm 4,2$	$15,8 \pm 4,8$	$13,5 \pm 4,6$
		( $p = 0,001^*$ )	( $p = 0,02^*$ )

Tab. 7: Hämodynamische Daten während der mVSD-Verschlüsse. mVSD = muskulärer Ventrikelseptumdefekt, MAP = mittlerer arterieller Druck, CVP = zentralvenöser Druck, PAP syst. = systolischer pulmonalarterieller Druck, PCWP = pulmonalkapilläre Wedgedruckmessung; \* signifikant

### 3.6.3 Druckverhältnisse im follow-up

Bis zur Abschlussuntersuchung nach drei Monaten normalisieren sich die Blutdruckwerte bei allen Tieren und sinken Richtung Basisniveau ab (Tab. 8 und Abb. 27).

Parameter	Basismessung	Nachuntersuchung nach 1 Monat	Abschlussuntersuchung nach 3 Monaten
MAD (mmHg)	$77,8 \pm 11,1$	$75,3 \pm 13,4$	$76,8 \pm 12,7$
ZVD (mmHg)	$7,4 \pm 2,6$	$8,5 \pm 3,6$	$7,6 \pm 4,7$
PAP syst. (mmHg)	$17,7 \pm 4,3$	$20,6 \pm 3,0$	$18,3 \pm 2,7$
PCWP (mmHg)	$10,3 \pm 4,2$	$9,4 \pm 2,9$	$8,4 \pm 2,0$

Tab. 8: Hämodynamische Daten während des follow-ups.: mVSD = muskulärer Ventrikelseptumdefekt, MAP = mittlerer arterieller Druck, ZVP = zentralvenöser Druck, PAP syst. = systolischer pulmonalarterieller Druck, PCWP = pulmonalkapilläre Wedgedruckmessung.

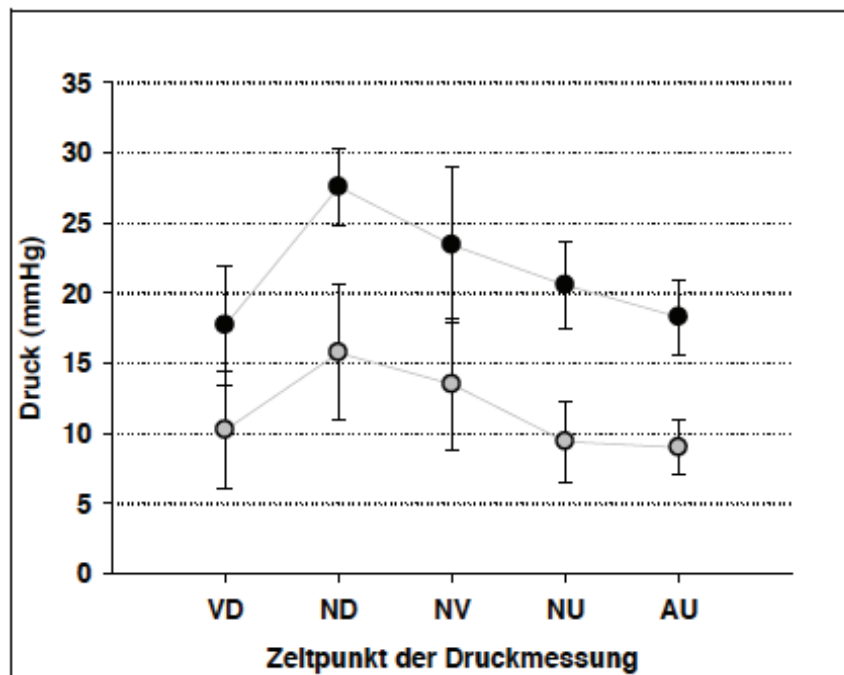


Abb 27: Entwicklung der pulmonal-arteriellen Druckwerte (schwarz) und pulmonalkapillären Verschlussdruckwerte (grau) während des follow-ups: VD = vor Defekt, ND = nach Defekt, NV = nach Verschluss, NU = Nachuntersuchung nach 1 Monat, AU = Abschlussuntersuchung nach 3 Monaten.

### 3.7 Histopathologische Aufarbeitung

#### 3.7.1 Makroskopische Evaluation

Alle explantierten Herzen waren soweit normal groß und von gleichmäßigem Colorit. Am Herzen des 9. Tieres, das bereits drei Tage postoperativ verstorben war, zeigte sich eine deutlich livide Verfärbung des Myokards im Bereich der beeinträchtigten Trikuspidalklappe. An allen anderen Präparaten konnten Schäden am Klappenapparat makroskopisch ausgeschlossen werden. Auch der linksventrikuläre Zugang war bei allen Herzen suffizient verschlossen und im Heilungsprozess unauffällig. Es konnten zu keiner Phase der des Heilungsprozesses thrombotische Auflagerungen im Bereich des Verschlussystems festgestellt werden.

Am Septum von Tier 2, das kurz nach Schaffung des VSDs verstorben war, zeigte sich ein erster Fibrinbelag der Defektränder und eine signifikante Gewebeeinblutung rund um den ausgestanzten VSD. Der VSD an sich war dabei glatt begrenzt, der Durchmesser lag bei 4-5 mm (Abb 28).

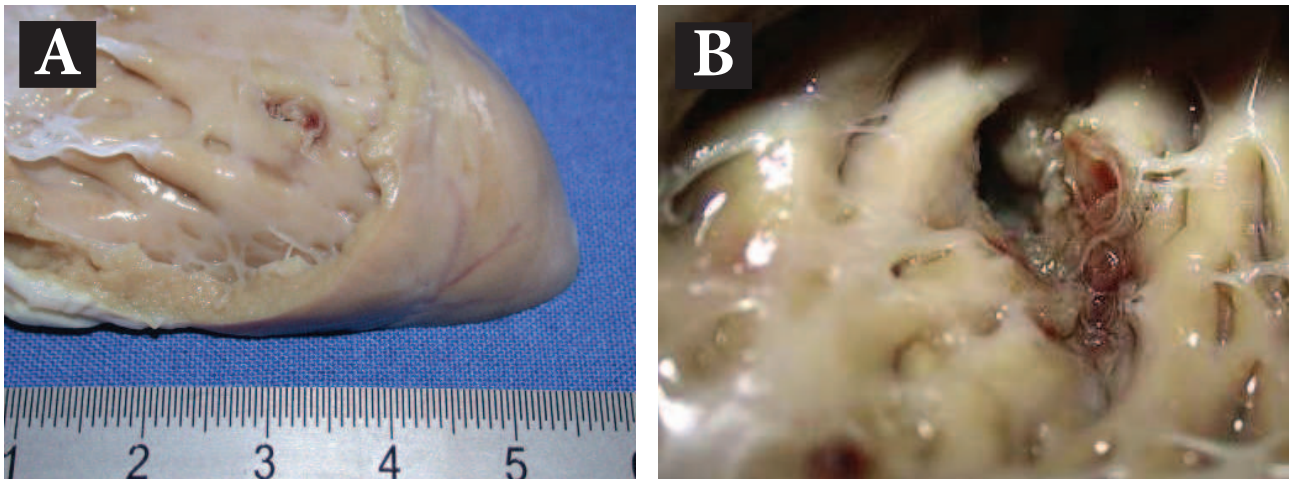


Abb. 28: Ausgestanzter mVSD direkt nach Intervention; A: Übersichtsaufnahme B: gezielte Vergrößerung des mVSDs.

Drei Tage nach erfolgreicher Intervention (Tier 9) war bereits eine zarte rötliche Schicht auf dem Patch, den Klammern und umgebendem Gewebe zu erkennen (Abb. 29 A), welche mit dem typischen Bild eines Fibrinbelages mit eingelagerten Erythrozyten vereinbar wäre (siehe 3.8.2). 14 Tage nach Patchimplantation (Abb. 29 B) stellte sich diese Schicht als weißlich verdichtet, glänzend und ohne erkennbaren Rand in die Umgebung auslaufend dar. Makroskopisch erschien der Patchbereich bereits komplett von einer neugebildeten Endothelschicht überzogen (Zur genauen histopathologischen Evaluierung der makroskopisch erhobenen Befunde siehe Punkt 3.8.2.).

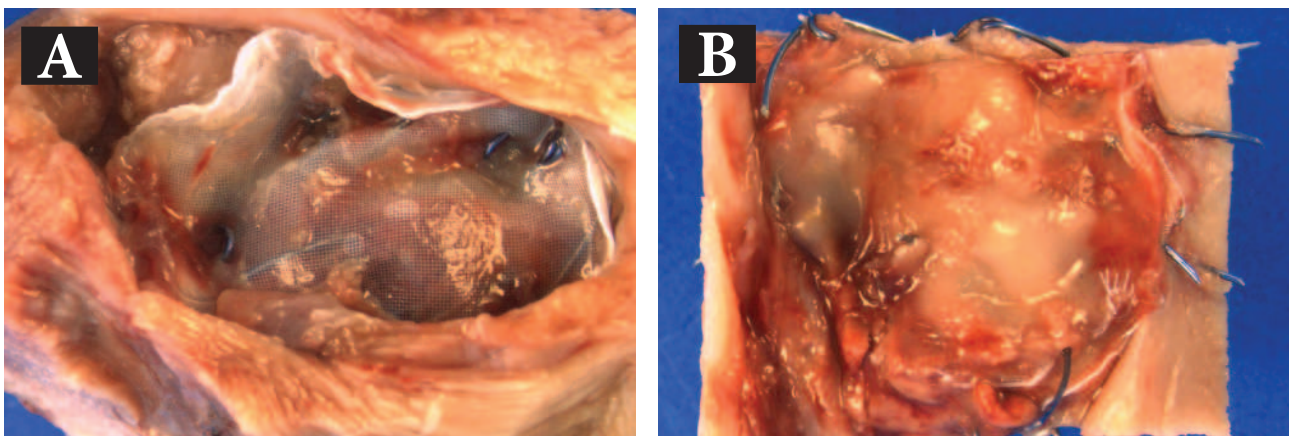
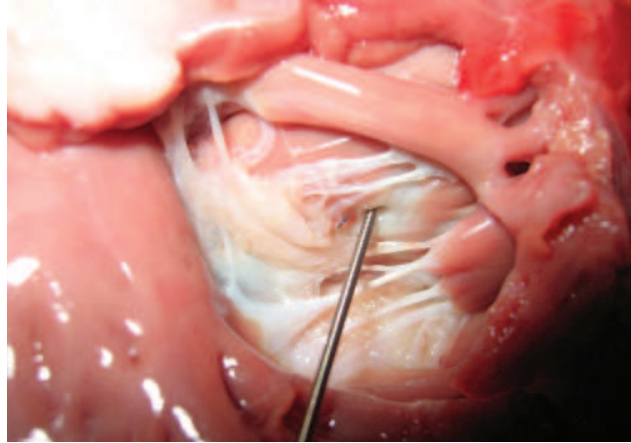


Abb. 29: Makroskopische Beurteilung des Integrationsverhaltens des Patches;  
A: Erster Fibrinbelag nach drei Tagen; B: Endothelialisierung nach 14 Tagen.

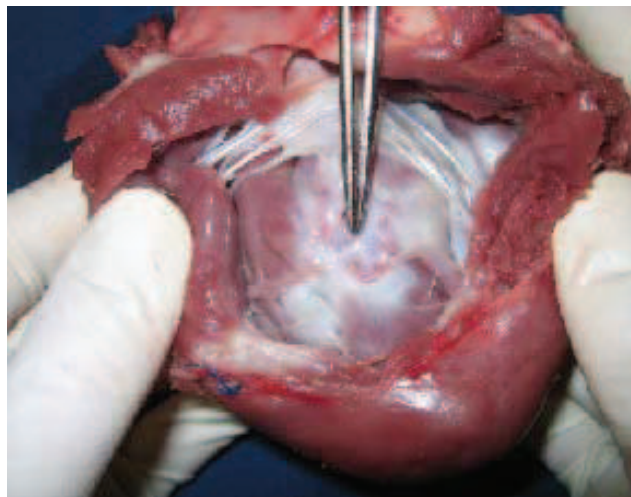
Nach drei Monaten waren der Kunststofflicken und die applizierten Nitinolklammern fast nicht mehr mit dem bloßen Auge zu erkennen und lediglich mit den Fingern zu tasten (Abb. 30). Bei Beurteilung der Patchpositi-

onierung an diesen Herzen fiel bei Tier 3 ein etwas randständig sitzender Flicker auf. Mit einer feinen Sonde konnte ein schmaler Rest-VSD dargestellt werden, welcher den bei diesem Tier aufgetretenen minimalen Restshunt erklärt (Abb. 30).



*Abb. 30: Minimaler Rest-VSD bei Tier 3 mit einliegender Sonde.*

An den anderen Herzen fand sich der Patch gut zentriert vor dem VSD und glatt anliegend. Er schien dabei von neoendotheliale Material überwachsen und war kaum vom umgebenden Myokard abzugrenzen (Abb. 31).



*Abb. 31: Der Patch ist nach drei Monaten komplett von Neoendothel überwachsen und kaum noch vom umgebenden Myokard abzugrenzen*

### 3.7.2 Histopathologie

Am Präparat kurz nach dem Defektsetzen findet sich ein dezenter Fibrinbelag an den VSDRändern. Im umgebenden Myokard ist die oben genannte hämorrhagische Infiltration auszumachen. Dieser Befund würde bei angeborenen Ventrikel-septumdefekten entfallen (Abb. 32).

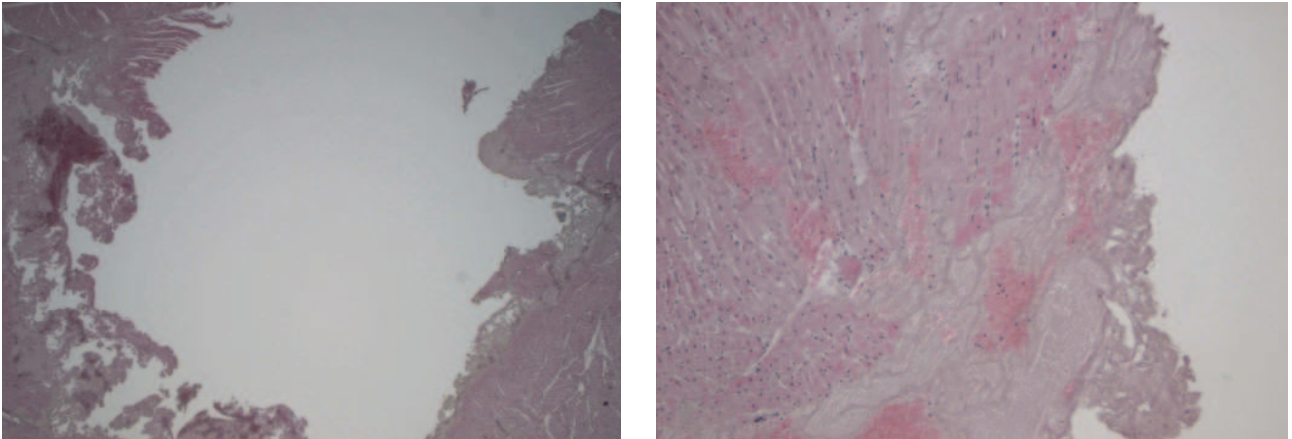


Abb. 32: Drei Stunden nach Ausstanzen des mVSDs. Rechts: Substanzdefekt mit Fibrinbelag an den Defekträndern. Links: Hämorrhagische Infiltration des Myokardgewebes.

Drei Tage nach Intervention kann die makroskopisch sichtbare zarte rötliche Schicht auf dem Patch des Herzens von Tier 9 histologisch als Fibrinschicht mit eingeschlossenen Erythrozyten bestätigt werden. Sie überzieht hier noch lückenhaft hauptsächlich Patch und Klammern (Abb. 33).

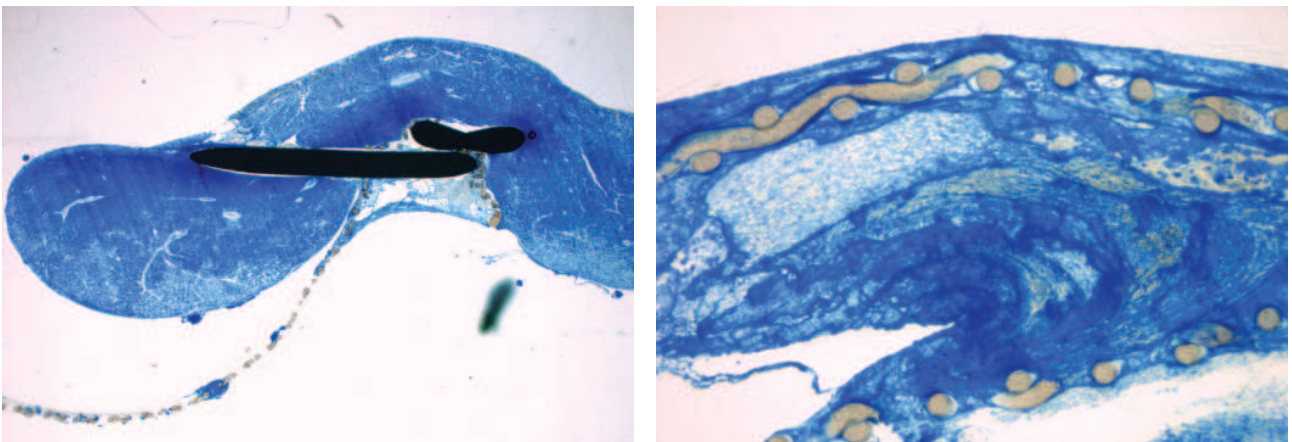


Abb. 33: 3 Tage nach Patchverschluss: Fibrinkondensation mit integrierten Erythrozytenresten besonders im Bereich des Polyesterpatches (grau). Links ein Überblick, rechts ein vergrößerter Ausschnitt des Patchbereiches.

Nach 14 Tagen ist das Verschlusssystem bereits teilweise von neugebildetem Endothel überzogen und mit fibromuskulären Zellen durchsetzt (Abb. 34).



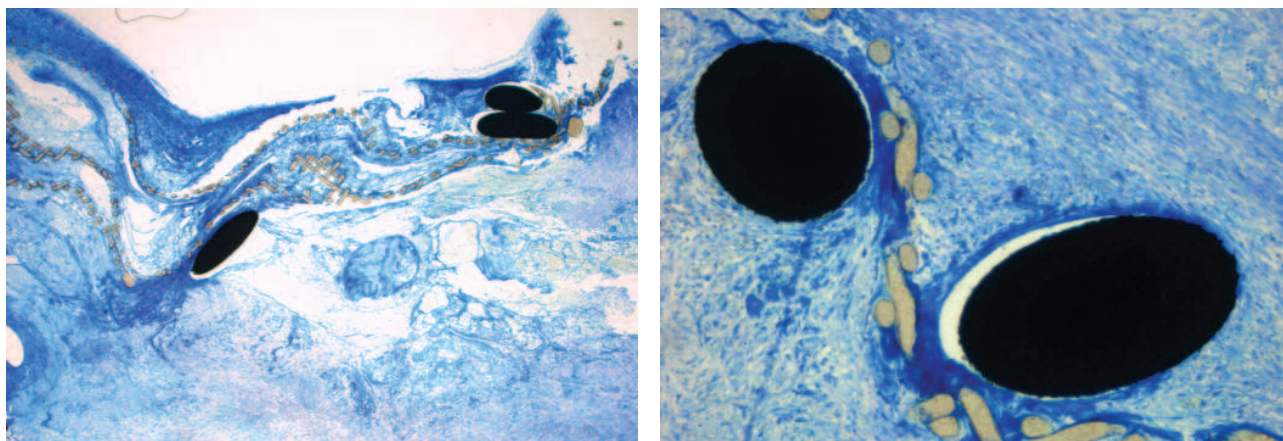


Abb. 34: 14 Tage nach Patchimplantation. Links: Ansätze von Neoendothel auf dem Patch (grau) und um die Nitinol-Klammern (schwarz). Rechts in Vergrößerung das beginnende Einwachsen fibromuskulärer Zellen.

Nach drei Monaten ist ein vollständiger Übergang der Endothelialisation in das umgebende Gewebe zu sehen. Patch und Klammern sind mit einer bis 1,6 mm dicken Schicht überwachsen. Die fortschreitende zelluläre Organisation zeigt sich nun auch im Septum direkt. Es sind kaum mehr Herde unorganisierter, thrombotischer Materials nachweisbar, stattdessen dominieren die fibromuskulären Zellen im ganzen Defektbereich. Auch neu einsprossende Kapillaren sind deutlich zu erkennen (Abb. 35).

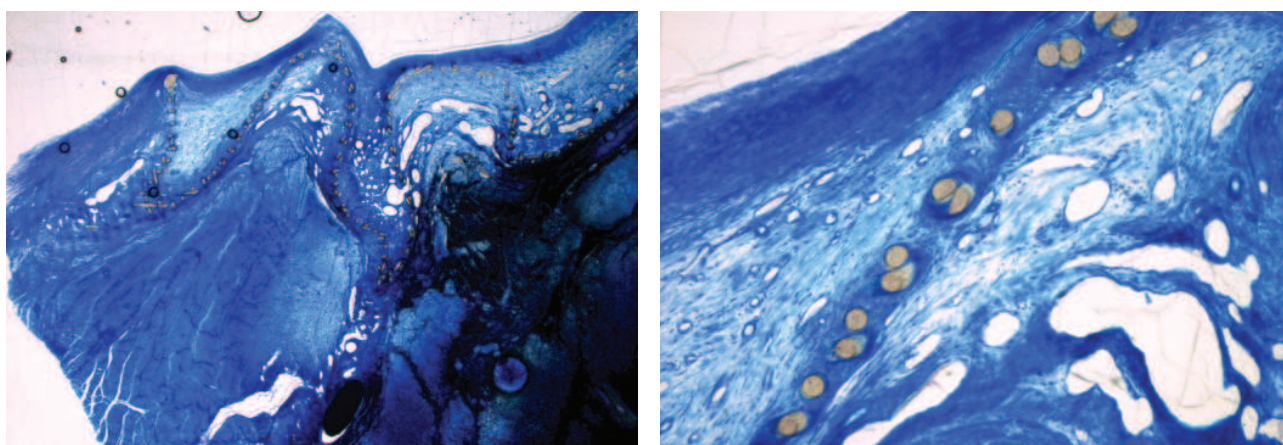


Abb. 35: 3 Monate nach Patchimplantation. Links: Komplette Neoendothelialisierung des Patches mit fortschreitender zellulärer Organisation des Septums. Rechts: Vergrößerung

In allen Präparaten ist an der Defektstelle eine milde bis moderate Entzündungsreaktion zu erkennen. Nach drei Tagen zeigt sich eine dichte lymphozytäre Infiltration des Herzgewebes mit wenigen Granulozyten. Um den Kunststofflicken und den Nitinolklammern finden sich auch nach 14 Tagen und drei Monaten einige Lymphozyten und Fremdkörperriesenzellen (Abb. 36). Die Ausbildung oberflächlicher Thromben kann auch mikroskopisch ausgeschlossen werden.

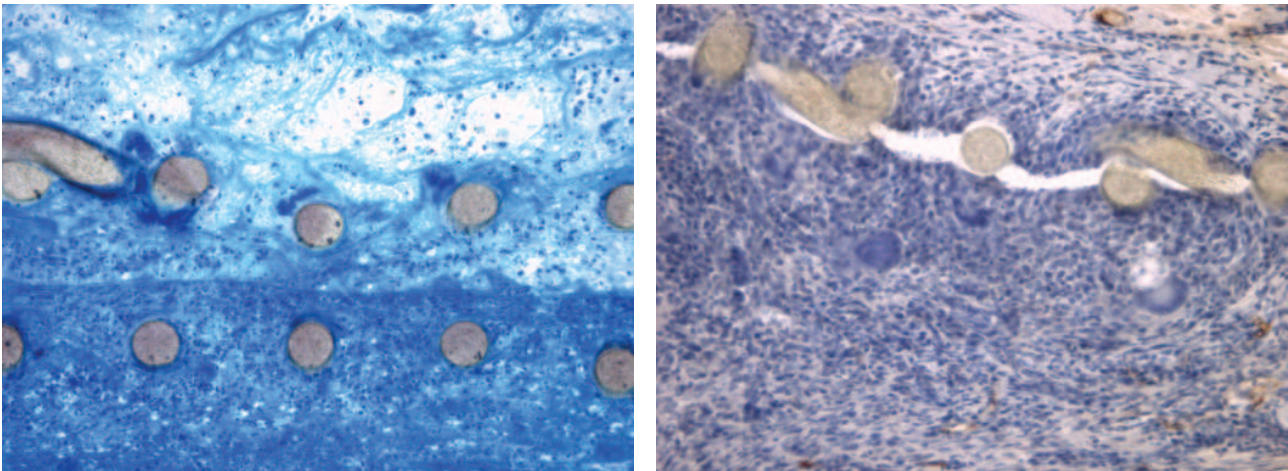


Abb. 36: Links: Inflammatorische Reaktion mit Lymphozyten und Fremdkörperriesenzellen in der Umgebung der Patchstrukturen. Rechts: Fremdkörperriesenzellen in der immunhistochemischen Untersuchung.

### 3.7.3 Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie

In der immunhistochemischen Untersuchung sollen die verschiedenen Zellen der Defektheilung gezielt angefärbt werden. So können mit SMA- und Vim-Färbung nach drei Monaten im Patchbereich fibromuskuläre Zellen und glatte Muskelzellen (braun) nachgewiesen werden, passend zur Neubildung von Epithel und ersten Blutgefäßen. Mittels der Antikörper gegen Von-Willebrand-Faktor werden schließlich die den Patch überlagernden Zellen als Endothelzellen identifiziert (Abb. 37).

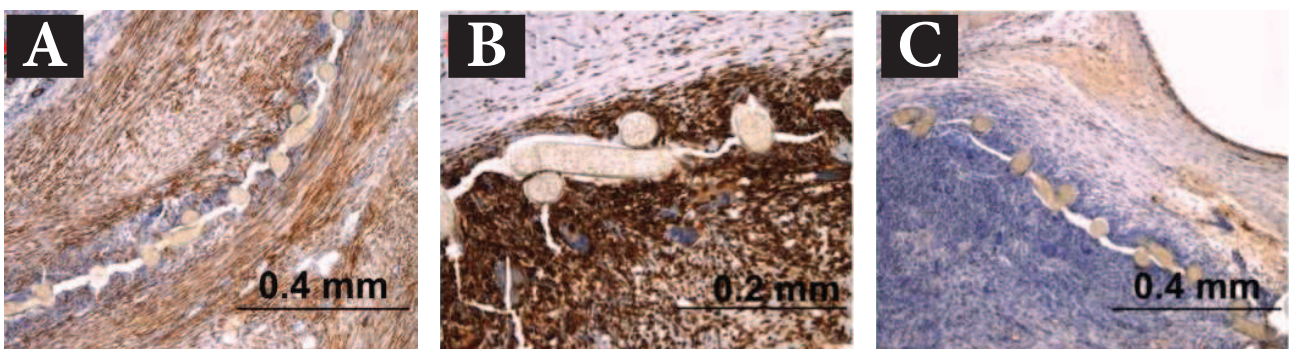


Abb. 37: Immunhistochemische Färbungen. Links: SMA-Färbung mit Darstellung fibromuskulärer Zellen (braun). Mitte: Die vim-Färbung zeigt fibromuskuläre Zellen (braun) um den Patch. Rechts: Die vWF-Färbung zeigt Endothelzellen auf dem Patch.

Unter dem Elektronenmikroskop kann letztendlich der lückenlose Überzug des Patchbereichs mit neu gebildetem Endothel im Detail bestätigt werden (Abb. 38).

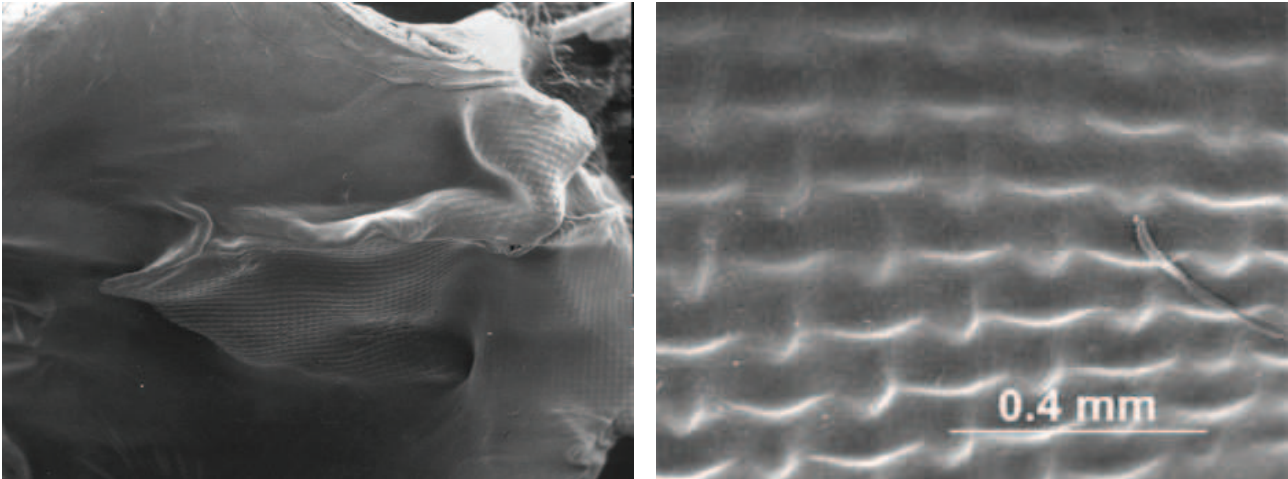


Abb. 38: Die Elektronenmikroskopie drei Monate nach Implantation zeigt die komplette Neoendothelialisierung des Patches.

## 4. Diskussion

Ziel der hier vorliegenden Dissertationsarbeit war die Evaluation einer neuen Hybridtechnik zum Verschluss von mVSDs im Langzeitverlauf im Tiermodell. Während eines Beobachtungszeitraums von drei Monaten sollten Verschlussresultat, Herzfunktion, Belastbarkeit der Tiere mittels Herzkatheteruntersuchung, Echokardiographie, Stress-Echokardiographie und MRT-Funktionsuntersuchung nach 1 und 3 Monaten beschrieben und ausgewertet werden. Besonderes Augenmerk lag auf den anschließenden histopathologischen Untersuchungen zur Biokompatibilität des neu etablierten Patchsystems.

Insgesamt zeigte sich ein suffizienter Verschluss der künstlich geschaffenen mVSDs mit einer sehr zufriedenstellenden Verschlussrate von 83,3%. Darüber hinaus zeigte sich, dass diese Hybridtherapie auch im Langzeitverlauf gute Resultate bezüglich Restshunts, Funktion der Herzklappen und Funktion des linken Ventrikels aufweist. Sieben von zehn Tieren (70%) durchliefen die Versuchsreihe bis zum Ende der chronischen Phase im dritten postoperativen Monat. Bei lediglich einem Tier (10%) ist das vorzeitige Ausscheiden aus der Studie auf einen technischen Fehler unserer Hybridtherapie zurückzuführen, zwei Tiere verstarben an unabhängigen perioperativen Komplikationen.

Die nach Abschluss der chronischen Versuchsphase durchgeführten histopathologischen Untersuchungen zeigten eine gute Biokompatibilität und vollständige Neoendothelialisierung der Patchsysteme nach drei Monaten.

### 4.1 VSD-Modell

Zur Etablierung des mVSD-Tiermodells und der neuartigen Verschluss technik unserer Arbeitsgruppe waren zunächst Ferkel deutscher Hausschweinrassen verwendet worden (Kozlik-Feldmann 2008 (A), Kozlik-Feldmann 2008 (B)). Für die Langzeituntersuchungen dieser Studie wurden „Göttingen Minipigs“ verwendet. Die Tiere aus der Zucht der Fa. Ellegard in Dänemark sind seit 1992 in der kardiovaskulären Forschung etabliert. Sie zeichnen sich durch einfaches Handling, kostengünstige Haltung, hohe Infektionstoleranz und große hämodynamische Stabilität aus (Beglinger 1975). Anatomie und Physiologie des Herzens sind mit den Charakteristika eines humanen Organismus vergleichbar (Stubhan 2008). Durch das niedrige Gewicht der Ferkel und vor allem durch die geringe Gewichtszunahme im Verlauf sind die Göttingen Minipigs® für eine chronische Versuchsreihe besonders gut geeignet.

Die mVSDs wurden in dieser Studie mittels eines speziell entwickelten Stanzgerätes artifiziell erzeugt (Kozlik-Feldmann 2008 (A)). Dabei kann der Untersucher die endgültige Lokalisation des Defektes relativ frei bestimmen. Hier wurde ein besonderes Augenmerk auf eine möglichst midmuskuläre bis apikale Position der VSDs gelegt. Diese stellen nach wie vor die größte Herausforderung für den chirurgischen und interventionellen Verschluss dar (Diab 2007) und profitieren so auch entscheidend von der Entwicklung einer neuen Verschluss-

alternative. Entsprechend den Vorgaben der Kommission für Tierversuche der Regierung Oberbayern mussten die hier künstlich erzeugten mVSDs sofort im Anschluss verschlossen werden, so dass über den natürlichen Heilungsverlauf dieser Defekte keine Aussage getroffen werden kann. Die Arbeitsgruppe Phillips et al. jedoch, die ein ähnliches Stanzgerät verwendete, konnte auch eine Woche nach erfolgreicher Intervention (73%) eine Persistenz ihrer künstlich geschaffenen VSDs mit LRS nachweisen (Philipps 2009), so dass wir davon ausgehen, dass sich auch unsere mVSDs ohne das applizierte Patchsystem nicht suffizient verschlossen hätten.

## 4.2 VSD-Verschluss in Hybridtechnik

### 4.2.1 Hybrid-Zugang und bisher verwendete Verschlussysteme

Das von uns verwendete Patchsystem zum Verschluss von mVSDs wurde in „Hybridtechnik“ angewandt; eine Kombination aus chirurgischen und interventionellen Techniken. Einer der größten Vorteile der Hybridtherapie im Vergleich zur rein chirurgischen Standardtherapie dürfte wohl das Vermeiden der HLM mit all ihren bisher bekannten Früh- und Spätfolgen auf den jungen Organismus (siehe 1.3.1, Bellinger 1995, Shann 2008) sein. Während so nach einem Eingriff unter HLM eine nachfolgende Therapie auf der Intensivstation unumgänglich ist, kann der Patient nach einem kurzen minimalinvasiven Hybrideingriff am schlagenden Herzen nach kurzer Überwachungsphase normalstationär weiter behandelt werden. Die damit verbundene Verringerung der physischen und psychischen Belastung des Patienten und seiner Angehörigen ergibt einen weiteren großen Vorteil der Hybridtherapie (Bacha 2005 (A), Bacha 2007, Chessa 2008, Schmitz 2008). Hinzu kommt das für den Patienten oftmals angenehmere kosmetische Ergebnis einer minimalinvasiven Operation. Sollte sich bei zusätzlichen Fehlbildungen am Herzen eine Verwendung der HLM nicht vermeiden lassen, so kann durch eine perventrikuläre Korrektur des VSDs in derselben Sitzung zumindest die Dauer der extrakorporalen Zirkulation, die Eingriffszeit insgesamt und damit auch die Kreislaufbelastung vermindert werden (Bacha 2005 (A)). Ein Hybrideingriff zeigt sich so wesentlich risikoärmer, weniger invasiv und mit verbesserten Therapieergebnissen vor allem bei Patienten unter 5 kg. (Hjordtal 2002, Bacha 2007, Amin 2008, Schmitz 2008).

Sowohl der rein chirurgische als auch der rein interventionelle VSD-Verschluss geraten vor allem bei schwierigen anatomischen Verhältnissen, etwa bei sehr kleinen Patienten mit limitiertem Gefäßstatus oder stark hypertrophiertem rechten Ventrikel an ihre Grenzen (siehe 1.3.1 und 1.3.2). Daher findet sich in den rein interventionellen Studien zum VSD-Verschluss auch kaum ein Einschluss der Neugeborenen oder Säuglingsgruppe; bei Thanopoulos et al. gilt ein Gewicht unter 4 kg als Ausschlusskriterium für einen interventionellen Eingriff (Thanopoulos 2005a, Diab 2007). Sind Patienten unter 4 kg eingeschlossen, so wird deutlich, dass diese Gruppe mit höheren Komplikationsraten behaftet ist als Patientengruppen höherer Gewichtsklassen. Zudem ist die Eingriffszeit bei sehr kleinen Kindern insgesamt verlängert und die Zahl der residuellen Shunts höher (Holzer 2004). Des Weiteren führen die zahlreichen Kathetermanöver bis zum definitiven Verschluss häufig zu Arrhythmien, hämodynamischer Instabilität und späteren Klappenschäden gerade bei kleinen Patienten (Bacha

2005 (A), Carminati 2007, Philipps 2009). Mit Einführung der Hybridtherapie ergab sich nun die theoretische Möglichkeit auch diese Patientengruppe, in der sich meist die wirklich therapiebedürftigen VSDs befinden, zu berücksichtigen. Sind keine zusätzlichen Herzfehlbildungen zu behandeln, kann über eine „Mini-Sternotomie“ der rechte oder linke Ventrikel punktiert werden und das Verschlussystem ohne große Umwege direkt in den echokardiographisch dargestellten VSD implantiert werden (Bacha 2003). Damit werden vaskuläre Limitationen umgangen und das Risiko der hämodynamischen Instabilität durch eine kurze und einfach zu handhabende Prozedur verringert.

In den letzten Jahren haben sich zum interventionellen wie auch zum Hybridverschluss der mVSDs vorrangig die Amplatzer-Occluder der Firma AGA Medical Corporation, Golden Valley, MN, USA durchgesetzt. Die zur Implantation der MVSDO nötigen Schleusen haben derzeit eine Mindestgröße von 6-9 French, die zuführenden Systeme sind flexibel und der Nitinol-Occluder selbst ist in verschiedenen Größen verfügbar, so dass er dem jeweiligen VSD optimal angepasst werden kann. Das von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) geforderte Kriterium der Bergungsmöglichkeit des Implantates ist gegeben und so wurde das Verschlussystem in den USA 2007 zum klinischen Gebrauch zugelassen. Dennoch gibt es auch für dieses System Limitationen, die einen breitflächigen Einsatz bisher verhindern. Zum einen scheint die Handhabung deutlich schwieriger zu sein, als die des perimembranösen Amplatzer-Occluders (Thanopoulos 2005a). Das interventionelle System kreuzt den mVSD von rechts- nach linksventrikulär. Während die linke Scheibe der Amplatzer meist gut zu entfalten ist behindert die Morphologie der rechten muskulären Ventrikelseptumseite oft die optimale Entfaltung der rechten Scheibe, wie bei der Studie von Diab et al. 2007. Der Defekt des Patienten lag hier zu apikal, so dass das Verschlussystem schwer zu manövrieren war. Nach erfolgreicher Kreuzung des VSDs ließ sich zwar die linke Scheibe gut entfalten, rechts war dies durch das hohe Maß an Trabekeln aber auch nach mehreren Versuchen nicht möglich. Statt des MVSDO wurde hier letztendlich ein Amplatzer-Duct-Occluder implantiert, dem in seiner „pilzförmigen“ Konfiguration die rechtsseitige Scheibe fehlt (siehe Abb. 5.1 B, 1.3.2). Auch bei Bacha et al. 2005 (A) konnte in einem 3 kg schweren Säuglings eine komplette Entfaltung nicht erreicht werden, ohne die Sehnenfäden der Trikuspidalklappe zu tangieren. Der mVSD musste nachfolgend offen chirurgisch korrigiert werden. Bei diesem Patienten war es durch die Anlage eines pulmonalarteriellen Bändchens zu einer Rechtsherzhypertrophie gekommen, die die interventionelle VSD-Lokalisation und Positionierung des Verschlussystems nahezu unmöglich machte.

Eine weitere Problematik der VSD-Occluder-Positionierung ist die starke Varianz der Dicke des Herzseptums. Diese nimmt gewöhnlich von proximal nach apikal stark zu. Je nach Lokalisation muss so die Länge des Verbindungsstückes zwischen den beiden Scheiben der Amplatzer-Systeme variiert werden (Amin 2008). Bacha et al. sehen die derzeit gebräuchliche Länge des Amplatzer-Systems von 7 mm vor allem bei hohen posterioren VSDs als ungünstig an. Hier ist das Septum typischerweise nur 4 – 5 mm dick, so dass eine optimale Anpassung der Verschlussysteme nicht erreicht werden kann. Eine zusätzliche Limitation der Amplatzer-Systeme, die vor allem den perimembranösen Systemen zu schaffen macht, ist die doch relativ sperrige Konstruktion (Vasilyev 2008, vgl. Abb. 39).

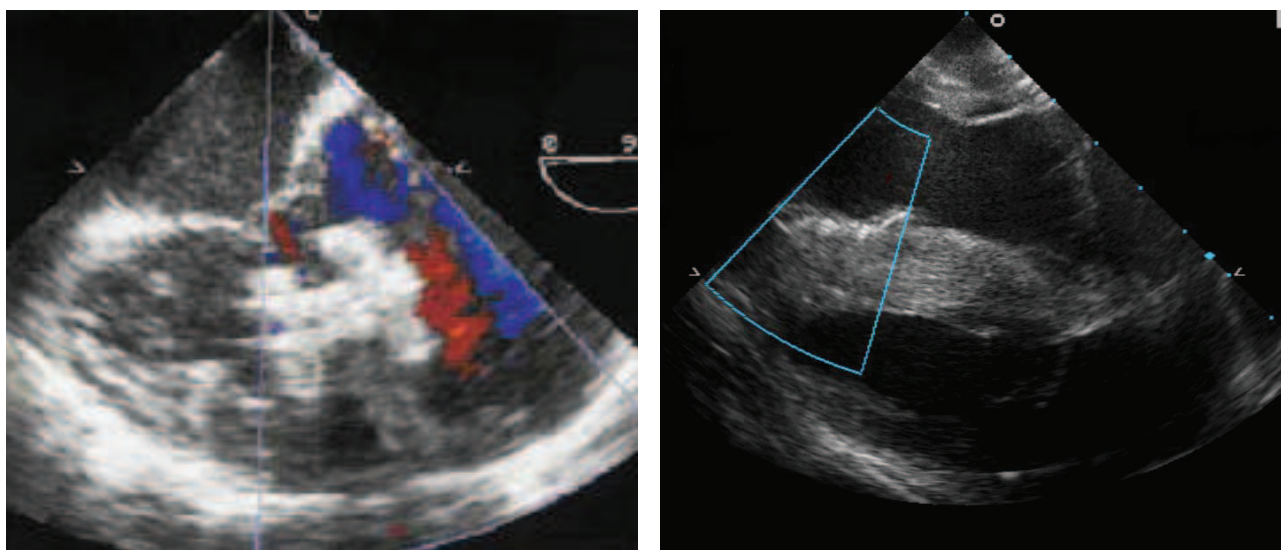


Abb. 39: Links AVSDO in situ aus Bacha 2005, dazu im Vergleich rechts das planare Patchsystem von Kozlik-Feldmann et al.

Die Befestigung des selbstzentrierenden Occluders wird allein durch Spannkkräfte gegen das umgebende Septummyokard garantiert. Die daraus resultierende Gewebekompression mit Ödembildung wird für die nach Implantation auftretenden Arrhythmien bis hin zum kompletten AV-Block in Betracht gezogen (Hu 2008). Somit stellt die Hybridtherapie der schwer zugänglichen VSDs bereits einen sehr guten Ansatzpunkt für die optimale Platzierung zukünftiger Verschlussysteme dar; die bisher verwendeten Occluder allerdings zeigen noch vielfältige Einschränkungen, die einen breitflächigen Einsatz im Klinikalltag verhindern.

Daher etablierte unsere Arbeitsgruppe nun ein planares Patchsystem, das einige dieser Limitationen zu umgehen weiß. Auch unser Verschlussystem wird in Hybridtechnik angewandt, mit dem Ziel, die Vorteile chirurgischer und interventioneller Techniken optimal auszuschöpfen. Das System an sich, bestehend aus einem Polyesterpatch, aufgespannt auf einen Nitinol-Rahmen, kann kathetergestützt in den linken Ventrikel eingebracht und dort vor dem VSD entfaltet werden (siehe 2.3 sowie Abb. 13). Fixiert wird der Patch mittels eines speziellen Klammerapplikationsgerätes über einen transthorakalen linksventrikulären Zugang (Abb. 14). Der direkte und sicherlich auch einfachere Zugangsweg über eine mediane Sternotomie war uns gemäß den Tierschutzrichtlinien allerdings nicht erlaubt. Daher musste eine anterolaterale Thorakotomie mit ungünstigerem Punktionwinkel und damit längerer Manipulationszeit in Kauf genommen werden. Im klinischen Einsatz kann dies mit der Sternotomie vermieden werden. Für den perventrikulären Zugang des Fixationsgerätes wurde eine 7-F Schleuse gewählt. Kleinere Schleusen wären denkbar. Durch Minimierung der Punktionsstelle ließe sich im späteren klinischen Gebrauch das Risiko eines punktionsinduzierten Pseudoaneurysmas oder einer Myokardnarbe verringern (Vasilyev 2008). Der Zugang über die linke Ventrikelwand, birgt zwar oben genannte Gefahren (Hanna 1999, Liu 2008), die Problematik der erschwerten VSD-Lokalisation durch die starke rechtsventrikuläre Trabekularisierung, die konsekutiv erschwerte Implantatfixation und etwaige Restshuntbildung bei rechtsventrikulärer Punktion wird allerdings umgangen (Diab 2007). Somit können auch die chirurgisch

von rechtsatrial schwer einsehbaren Defekte unterhalb des Moderatorbandes erreicht und suffizient verschlossen werden.

Im Gegensatz zu Occludern mit biventrikulärer Verankerung verwendeten wir in unserer Tierstudie ein sehr flexibles planares Verschlussystem, das auch vor apikalen mVSDs noch problemlos zu manövrieren ist (Abb. 39). Der Kunststoffpatch wurde hier allein linksventrikulär positioniert und befestigt und wird von der rechtsventrikulären Morphologie nicht beeinträchtigt. Auch die variable Anatomie des Herzseptums muss von unserem System nicht berücksichtigt werden. Das Patchsystem kann unabhängig von der Dicke des Septums und bei einem Minimum von 1 cm an freier muskulärer Begrenzung des VSDs befestigt werden. Die Fixierung mittels sehr schmaler Nitinol-Klammern bewirkt lediglich punktuellen Gewebekontakt mit dem umgebenden Myokard und damit ein geringeres Gewebetrauma. Fixationsbedingte Rhythmusstörungen, transiente oder gar permanente Blockbilder durch übermäßige Spannkraft auf das umliegende Gewebe waren während unserer Versuche nicht zu verzeichnen. Natürlich können diesbezüglich die hier behandelten mVSDs nicht mit den näher am Leitungssystem gelegenen pVSDs verglichen werden. Dennoch zeigt das von uns verwendete Patchsystem einige innovative Neuerungen auf, die wichtige Impulse für die zukünftige Entwicklung von m- und pVSD-Verschlussystemen geben können.

#### 4.2.2 Bildgebung in der Hybridtherapie

Mit zunehmendem Anteil perkutaner Therapiemöglichkeiten und Hybrid-Eingriffen zur Korrektur angeborener Herzfehlbildungen steigen der Bedarf und die Anforderungen an die bildgebende Technik (Bacha 2007). Besonders die Echokardiographie ist sowohl zur präinterventionellen Patientenselektion als auch als interventionsbegleitendes Verfahren der ersten Wahl essentiell (Vasilyev 2006, Amin 2008). Mittels transösophagealer 2D- oder im zunehmendem Umfang RT3D-Echokardiographie wird zunächst der Defekt und umliegende Strukturen lokalisiert und schließlich der Ablauf der Hybridprozedur live am schlagenden Herzen verfolgt. So lassen sich zum einen die operationsbedingten Auswirkungen auf Ventrikeldynamik und Klappenfunktion sofort nachvollziehen, zum anderen auch der Erfolg des VSD-Verschlusses direkt evaluieren. Während bei chirurgischem Verschluss unter extrakorporaler Zirkulation Herzrhythmusstörungen und verbliebene Restshunts erst nach Beendigung des Eingriffs offensichtlich werden, kann bei einem Hybrideingriff der Sitz des Verschlussystems sofort nachjustiert werden. Zudem sind die mVSDs aus chirurgischer Sicht transatrial oder transventrikulär oft unter dem Trikuspidalklappenapparat verborgen und damit schwer zu lokalisieren und einzugrenzen (Soto 1989, Bol-Raap 1994). In einem 3D-Datensatz dagegen kann das vordergründige Trikuspidalklappengewebe ausgeblendet werden, so dass eine Evaluation des darunterliegenden VSDs ohne Sichtbehinderung möglich ist (van den Bosch 2006). Zur Ausweitung der bisherigen Einsatzmöglichkeiten der Echokardiographie wären vor allem bei der Anwendung an Neugeborenen und kleinen Kindern mit geringem echokardiographischem Fenster und schneller Herzfrequenz allerdings noch weitere Verbesserungen der räumlichen Auflösung, bestenfalls in Echtzeit, von großer Wichtigkeit.



Das zweite große Standbein jeglicher Katheterinterventionen und auch der Hybridtechniken ist die Durchleuchtung. Nach Carminati et al. werden im europäischen Register für den interventionellen VSD-Verschluss Durchleuchtungszeiten von bis zu 150 min. verzeichnet (Carminati 2007). Im Vergleich zu rein interventionellen Vorgehensweisen könnte durch die lediglich punktuelle Anwendung während der Hybridtechnik die Strahlenbelastung auf den jungen Organismus gesenkt werden. Aufgrund der Artefaktbildung metallischer Instrumente und mangelnder Darstellung kleinerer metallischer Objekte (Klammern, Nadeln) unter Echokardiographie kann bisher auf die Anwendung der Durchleuchtung noch nicht verzichtet werden. Die Entwicklung eines ultraschallkompatiblen Überzugs oder der Methode des „magnetic trackings“ metallischer Implantate bietet derzeit hier schon erste Lösungsansätze (Suematsu 2005, Novotny 2007).

Die neuen hochmodernen Hybridoperationssäle bieten mit der Integration flexibler Durchleuchtungsanlagen und neuester Echokardiographietechniken die besten Voraussetzungen zur optimalen visuellen Überwachung der intrakardialen Prozeduren. Diese kostenreiche Ausstattung stand uns im Tierversuchslabor leider noch nicht zur Verfügung. Mit den einfacheren technischen Gerätschaften war das Hybridverfahren hier an kompliziertere Implantationsmanöver und eine insgesamt längere Versuchsdauer geknüpft. Während der Vorgang der mVSD-Schaffung, der entstandene Shunt und die Lage des Patchsystems vor, während, und nach Verschluss kontinuierlich mittels epikardialer 2DEchokardiographie verfolgt wurden, erfolgte die Applikation der Fixationsklammern unter Durchleuchtung. Zusätzlich wurde an einigen Tieren mit einem 3D-Echokardiographie-Gerät gearbeitet. Hiermit konnte eine Art transventrikuläre „en face view“ auf Septum und Patch erreicht werden. Die zusätzliche Bildebene erleichterte die Bestimmung der Lageverhältnisse von Patchsystem zu Ventrikelseptum und die Beurteilung des Winkels des auftreffenden Klammernahtgerätes wesentlich. Die anspruchsvolle Kombination der verschiedenen bildgebenden Verfahren führte allerdings in zwei Fällen zu technischen Schwierigkeiten mit dem Hybridsystem, so dass die jeweiligen Versuche vorzeitig abgebrochen werden mussten. Bei Tier 2 war die Position des Patchsystems vor dem Ventrikelseptum echokardiographisch schwierig darzustellen und mit der zusätzlichen Bildebene unter Durchleuchtung nur schwer in Einklang zu bringen. Die fehlende räumliche Sicht führte nach langwierigen Platzierungsversuchen zur Fehlpositionierung des Patches und Verletzung von Sehnenfäden und Papillarmuskeln. Auch in Tier 12 wäre wahrscheinlich durch ein besseres Zusammenspiel der bildgebenden Verfahren die gefährliche Nähe zur Trikuspidalklappe früher ersichtlich gewesen, so dass durch intraoperatives Nachjustieren der Patchposition ein besseres Verschlussresultat erreichbar gewesen wäre. Nach unseren Erfahrungen ist die eine gute räumliche Orientierung für die Anwendung der modernen Hybridtechnik von entscheidender Wichtigkeit. Wie auch Vasilyev et al. halten wir eine Weiterentwicklung der bildgebenden Technik für eine der Schlüsselkomponenten des Erfolges der Hybrid-Therapie (Vasilyev 2008).

### 4.3 Evaluierung des Verschlusssystems im follow-up

#### 4.3.1. Echokardiographie, Stressechokardiographie und MRT-Untersuchung

Ein ideales neues VSD-Verschlusssystem sollte dem Septumdefekt möglichst einfach zuzuführen sein und dabei möglichst gering-invasiver Methoden bedürfen; es sollte wenig Fremdmaterial enthalten, selbst-entfaltend, selbst-zentrierend und im Notfall zu bergen sein (Amin 1999 (A)). Ein weiterer wichtiger Punkt zur Bewertung eines neuen Verschlusssystems ist das Auftreten residueller Defekte nach Implantation. Verbliebene Defekte nach chirurgischer Korrektur verschließen sich unter einem Durchmesser von 2 mm zumeist spontan innerhalb eines Jahres, bei größeren Durchmessern kann nicht mehr von einem Spontanverschluss ausgegangen werden (Dodge-Khatami 2007). Die junge Disziplin der interventionellen und Hybrid-VSD-Verschlüsse hat bisher noch keine Langzeitergebnisse bezüglich der Entwicklung residueller Shunts hervorgebracht. Nach den Ergebnissen von Thanopoulos et al. zeichnet sich allerdings eine dem chirurgischen Verschluss ähnliche Entwicklung ab (Thanopoulos 2003). Restdefekte können im Verlauf weiter an Größe zunehmen sowie zu Hämolyse, Thrombenbildung und Endokarditiden führen (Meguro 1992, Yang 2000, Kanemitsu 2009). Entsprechend den Richtlinien zur Endokarditisprophylaxe bei Verwendung von prosthetischem Material würde auch der residuelle Shunt nach Hybridverschluss für den betroffenen Patienten eine lebenslange Antibiotikaeinnahme bedeuten (Leitlinien der American Heart Association, Stand 2007). Dementsprechend gilt eine Minimierung des Auftretens residueller Shunts als eines der wichtigsten Kriterien bei der Entwicklung neuer VSD-Verschlusssysteme. Nach chirurgischer Korrektur kommt es in 1-20% der Fälle zum Auftreten von Restdefekten (Roussin 1996, Wollenek 1996, Yang 2000). In den bisherigen kurzen Verlaufsstudien konnte keine Überlegenheit der interventionellen Systeme gezeigt werden (Xunmin 2007, Vasilyev 2008, Zheng 2009). In unserem experimentellen Hybridansatz trat im follow-up lediglich bei einem Tier ein trivialer Restshunt von 2 mm auf. Im Gegensatz zur chirurgischen Patchnaht, bei der die Stiche sehr nah aneinander gesetzt werden müssen um Restshuntbildung zu vermeiden, sind für das planare Hybridssystem lediglich etwa acht Nitinol-Klammern zum Komplettverschluss nötig. Die Implantation im Hochdrucksystem des linken Ventrikels resultiert in einer direkten Kompression des Polyesterflickens gegen das muskuläre Septum und vermindert zusätzlich die Ausbildung von Restdefekten.

Neben der Frage nach residuellen Shunts zählt bei interventionellen Eingriffen auch die Gefahr der Klappenschäden zu den wichtigen Kritikpunkten. Auch in unserer Studie ergaben sich in den echokardiographischen Verlaufsuntersuchungen milde Klappeninsuffizienzen, die auf die Manipulation während des interventionellen Teils der Hybridtechnik zurückzuführen sind. Vorallem die Aortenklappe wurde durch die noch relativ große Schleuse des Patchsystems tangiert. Alternativ wurde in einer Studie unseres Kooperationspartners Vasilyev et al. ein zweiter transapikaler Zugang zur Positionierung des Patchsystems verwendet (Vasilyev 2008). Damit müssen aber die Nachteile einer weiteren, wenn auch nur geringen Schädigung des linken Ventrikelmyokards in Kauf genommen werden. Ein Vergleich dieser beiden Therapieansätze im Langzeitverlauf steht noch aus.

Die minimale linksventrikuläre Inzision zur Schaffung des Defektes und auch zum Einbringen des Klammerapplikators führte in den echokardiographischen und magnetresonanztomographischen Verlaufsuntersuchungen zu keiner Beeinträchtigung der Myokardfunktion. In der Stressechokardiographie zeigte sich lediglich im Patchbereich des Septums eine geringe regionale Dysfunktion. Nach Pacileo et al. wäre ein solcher Befund auch nach jeder chirurgischen Defektnaht zu erwarten (Pacileo 1998). Magnetresonanztomographisch bestätigten sich die bereits echokardiographisch erhobenen Befunde. Die verspätete Hyperdensität mit extrazellulärem Kontrastmittel in der T1-Phase der Untersuchung entspricht typischerweise (reversibel) geschädigten Myozyten oder bindegewebigen Umbauten (Fibroseareale) nach Infarkt (Prakash 2004, Hunold 2007). Gebiete mit unbeschädigten, vitalen Myozyten erscheinen hypodens (Kim 1999, Rehwald 2002, Foo 2002). Zeigt sich nun wie in unserer Tierstudie ein Bereich mit fleckig verteilten angereicherten und nicht anreichernden Zellen („patchy enhancement“) so deutet dies auf ein enges Nebeneinander von vitalen und avitalen oder fibrotisch veränderten Zellstrukturen hin. Dies verdeutlicht zum einen die bestehende Entzündungsreaktion im Bereich des künstlich geschaffenen VSDs, zu anderen aber auch den fibrotischen Umbau des geschädigten Myokards. Zum MRT-Verhalten interventioneller Implantationssysteme gibt es derzeit noch keine weiteren spezifischen Arbeiten. Harris et al. kommen in ihrer Studie zur magnetresonanztomographischen Evaluierung des chirurgischen Verschlusses allerdings zu vergleichbaren Ergebnissen (Harris 2007). Auch die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen unserer eigenen Explantate stehen im Einklang zu den MRT-diagnostisch erhobenen Befunden (s.u.).

Anzumerken ist, dass die Ergebnisse der Langzeit-Funktionsbeurteilung des Patchsystems, wie RVSDs und Klappenfunktion, zukünftig entscheidend von den angestrebten Verbesserungen in der Bildgebung profitieren würden. Eine bessere räumliche Übersicht mindert zum einen die Gefahr der Fehlpositionierung und damit der RVSDs, zum anderen kann durch die bessere Orientierung auch die Implantationszeit und damit die Gefahr der Klappenschäden vermindert werden. Daher stehen Verbesserungen im Bereich der Bildgebung an wichtiger Stelle unserer zukünftigen Projekte.

#### 4.3.2 Hämodynamik

Während des Verschlussprozesses zeigten sich alle Versuchstiere dieser Studie kreislaufstabil und benötigten keinerlei katecholaminerge Unterstützung. In einigen Tieren kam es durch das akute Auftreten des LRS zu einem Abfall des systemischen Blutdruckes wie es durch den abrupten Verlust an Herzzeitvolumen durch den Shunt zu erwarten war. Eine ähnliche hämodynamische Entwicklung wird bei akuten Septumdefekten nach Infarkt bei erwachsenen Patienten beschrieben (Deja 2000). Nach der Fickschen Methode konnte in unserer Tierstudie ein mittleres Shuntvolumen von 27,96% berechnet werden. Sowohl in den echokardiographischen als auch in den makropathologischen Untersuchungen zeigte sich allerdings, dass der wirkliche substanzielle

Defekt deutlich größer war als durch die oxymetrische Shuntmessung zu erwarten gewesen wäre. Entsprechend den erhöhten Flussvolumina im kleinen Kreislauf konnten nach Schaffung des Defektes erhöhte pulmonalarterielle Drücke nachgewiesen werden. Die gemessenen Lungendruckwerte liegen mit  $22,4 \pm 2,5$  mmHg PAP und  $10,6 \pm 2,4$  mmHg PCWP im Bereich der Werte, die auch bei natürlich vorkommenden VSDs im Kindesalter erhoben werden (Lapp 2009). Es ist anzunehmen, dass die Tiere eine absolute pulmonale Hypertonie mit Mittelwerten über 30 mmHg PAP bis zum Verschluss nicht stabil überstanden hätten. Nach Patchverschluss kam es zu einer deutlichen Abnahme der Lungendruckwerte bis Versuchsende. Das Shuntvolumen konnte signifikant reduziert werden ( $p = 0,0119$ ). Die Verlaufsuntersuchungen nach drei Monaten zeigten eine Normalisierung der Druckverhältnisse. Diese Ergebnisse verdeutlichen zum einen die Volumenwirksamkeit des künstlich geschaffenen Shunts mit den entsprechenden hämodynamischen Gegenregulationsmechanismen des Lungenkreislaufes zum anderen den suffizienten Verschluss desselben im Anschluss mit zunehmender Integration des Patchsystems in das Herzendothel und die adäquate Adaptation des Kreislaufs auf die sich verändernden Flussverhältnisse.

## 4.4. Untersuchungen zur Biokompatibilität des neuartigen Patchsystems

### 4.4.1 Beurteilung der Verträglichkeit des Nitinols

Die am häufigsten verwendeten Materialien perkutaner Verschlusssysteme sind Nitinol und medizinisches Edelstahl. Systeme aus Nickel-Titan-Legierungen weisen nach bisherigen Untersuchungen eine gute Biokompatibilität auf (Barras 2000, Sigler 2000, Singh 2007, Sigler 2007, Foth 2009). Trotz guter Studienergebnisse und ausgezeichneter klinischer Erfahrungen mit Nitinol-Implantaten führt der Nickel-Anteil von 55% nach wie vor zu kontroversen Diskussionen vor allem in Bezug auf nickelsensibilisiertes Patientengut. Rigatelli et al. veröffentlichten 2007 ihre Erfahrungen an 9 Patienten, die sich trotz präoperativ positivem Nickel-Epikutan-Test zur ASDO-Implantation entschieden. Drei Tage postoperativ entwickelten 8 von 9 Patienten einen vom Autor als „device syndrom“ beschriebenen Symptomkomplex. Dieser äußerte sich in thorakalem Unwohlsein, Dyspnoe, Müdigkeit und milder Leukozytose. Nach antiinflammatorischer Therapie mit Prednison erholten sich die Patienten binnen kürzester Zeit (Rigatelli 2007). Nickel allein ist das häufigste Kontaktallergen der Industrienationen. Es kann in sensibilisierten Patienten schwerwiegende respiratorische Komplikationen, allergische Reaktionen und behindertes Zellwachstum hervorrufen (Barras 2000). In einer Studie an 67 Patienten konnten ein Anstieg des Nickelwertes von 0,47 ng/ml Blut vor ASDO-Implantation auf einen Spitzenwert von 1,5 ng/ml Blut einen Monat nach Implantation gemessen werden (Ries 2003). Im follow-up fielen diese Werte allerdings innerhalb zweier Monate wieder auf das Ausgangsniveau hin ab. Titanium als zweiter Bestandteil der „NiTi“-Legierung zeigt sich dagegen gänzlich reaktionsfrei. Nickel und Titan bilden in dieser Kombination eine starke Verbindung und machen Nitinol damit gegenüber der Oxidation der Nickelionen resistent (Barras 2000). In genaueren histopathologische Untersuchungen der Nitinol-Systeme konnte gezeigt werden, dass sich während des Einwachsens ein vor Korrosion schützender Titaniumoxid-(TiO<sub>2</sub>)-Mantel um das Nitinolgeflecht legt, der die Nickelionenfreisetzung unterbindet (Barras 2000, Sigler 2000, Lai 2005). Edelstahl enthält zwar im Vergleich lediglich 13% Nickel-Anteil, ist allerdings viel weniger korrosionsbeständig, so dass auch hier adverse Reaktionen beschrieben wurden (Kanerva 1994, Barras 2000, Sigler 2000, Vincent 2003, Ehrnrooth 2009). Nicht nur das verwendete Material, sondern auch die Größe des Implantates bzw. der Metallanteil beeinflussen die Nickel-Belastung des Körpers. So konnten Gordon et al. in einer explorativen Befragung von 100 Interventionisten feststellen, dass die wenigen gemeldeten Hypersensitivitätsreaktionen besonders nach Einsatz großer bis sehr großer Amplatzer-Systeme auftraten (Gordon 2009). Singh et al. berichten über die erfolgreiche Implantation eines Cardio-Seal-Schirmchens zum ASD-Verschluss bei einer Patientin, die bei Hautkontakt mit den üblichen Amplatzer-Occludern eine Kontaktdermatitis entwickelt hatte. Das Cardio-Seal-Schirmchen enthält einen niedrigeren Metallanteil und provozierte keine Hautreaktion (Singh 2004). Das von uns verwendete Patchsystems zeichnet sich durch einen minimierten Metallanteil aus (der Patchrahmen wird nach Fixierung entfernt, es verbleiben etwa acht kleine Nitinol-Klammern). Somit kann hier von einem eher geringen Risiko einer Fremdkörperreaktion ausgegangen werden, spezifische Untersuchungen dazu stehen allerdings noch aus. Zudem darf auch nicht vernachlässigt werden, dass trotz weitreichender Diskussionen, adverse Reaktionen nach Implantation nickelhaltiger Systeme ein klinisch eher selten gesehenes Phänomen darstellen. Nach der

explorativen Studie des „Congenital Cardiovascular Interventional Study Consortiums“ (CCISC, Gordon et al.) glauben zwar 80% der Interventionisten, dass eine Hypersensitivitätsreaktion auftreten kann, nur etwa die Hälfte davon berücksichtigt diesen Punkt allerdings in der präoperativen Anamnese und kein Einziger der Befragten führt vor Implantation gar einen Allergietest durch. Unter 1600 eingesetzten Systemen fanden sich 33 Fälle mit allergietypischen Reaktionen (Inzidenz 0,02% in diesem Patientenkollektiv), die alle auf eine kurzzeitige Gabe von Prednison ansprachen. Explantationen waren nicht nötig (Gordon 2009). Da mit zunehmender Zahl der interventionellen Eingriffe und zunehmender Verweildauer der Implantate (wachsende EMAH-Patientenzahl) die Anzahl der gemeldeten adversen Reaktionen aber auch ansteigen dürfte, stellt die Biokompatibilität intrakardialer Verschlussysteme auch zukünftig einen wichtigen Beobachtungspunkt dar.

#### **4.4.2 Histopathologische Aufarbeitung der Explantate**

##### **Makroskopische Evaluation**

An 10 Herzen wurden bei Versuchsende makroskopische und histopathologische Untersuchungen durchgeführt. In einem Tier fand sich dabei ein etwas randständig sitzender Patch mit echokardographisch sichtbarem minimalem Restshunt (Tier 3). In allen anderen Herzen zeigte sich der Patch unter makroskopischer Aufsicht optimal über dem mVSD platziert und adäquat fixiert. Bei digitaler Untersuchung konnten keine Dehiszenz des Patches oder Lockerung der Nitinolklammern eruiert werden.

Zudem war in den Explantaten nach drei Monaten eine komplette Septum-Integration des Patches und der Klammern auszumachen. Es fanden sich keine vorstehenden, nicht endothelialisierten Anteile des Systems. Gerade solche prominente, nicht überwachsene Abschnitte hatten bei anderen Verschlussystemen immer wieder zu gefährlichen thrombembolischen Komplikationen geführt. (Amin 1999 (A), Krumsdorf 2004, Sherman 2004, Vasilyev 2008, Sigler 2007, Ding 2009, Vogt 2009, Foth 2009). Zu keinem Untersuchungszeitpunkt fanden sich in unseren Explantaten thrombotische Auflagerungen. Diese makropathologischen Ergebnisse bestätigen, dass unsere neue Verschlussstechnik mVSDs suffizient verschließen kann und im Verlauf bei guter makroskopischer Integration keine oberflächliche Thrombusbildung zeigt.

### Histologie und Immunhistochemie

Auch histopathologisch fand sich kein Hinweis auf eine oberflächliche Bildung von sekundärem Thrombusmaterial. Innerhalb des VSD-Kanals und im Patchbereich ist hingegen eine gewisse „Primärthrombogenität“ durchaus erwünscht, um schnell einen zellulären Verschluss des Defektes zu erreichen (Sigler 2005). Polyester und andere textile Materialien haben sich dabei als besonders geeignet erwiesen und werden speziell zu diesem Zweck in Verschlussysteme integriert (Sigler 2005). Der Polyesterflicken unseres Systems zeigte sich bereits drei Tage nach Implantation von einem dünnen Fibrinnetz mit eingeschlossenen Erythrozyten bedeckt. Dieser lose Zellverband sollte sich nach VSD-Verschluss zügig zu festem fibromuskulärem Gewebe wandeln, um eine Rekanalisation im Verlauf zu verhindern und eine eventuell neu auftretende Shuntwirkung zu unterbinden (Sigler 2000). In Nitinolbasierten Verschlussystemen fand diese Umorganisation des Zellmaterials innerhalb von sechs Wochen statt. Edelstahl-basierte Systeme dagegen erreichten dies erst nach sechs Monaten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diesbezüglich den Nitinol-Systemen der Vorzug gegeben werden sollte (Sigler 2000).

Nach 14 Tagen ist unser neuartiges Hybridsystem bereits über weite Teile von Neoendothel überwachsen und mit fibromuskulären Zellen durchsetzt. Drei Monate nach Implantation schließlich sind der Patch und die Nitinol-Klammern komplett in das Septum integriert und von einem konfluierenden Zellverband bedeckt. Diese Zellen konnten immunhistochemisch mit vWF-Färbung markiert und damit als neu gebildete Endothelzellen identifiziert werden. Die Elektronenmikroskopie bestätigt diesen Befund. Mit vim- und SMA-Färbung lassen sich zudem nach drei Monaten die fortgeschrittene zelluläre Organisation und beginnende Neoangiogenese aufzeigen.

Dieser stadien typische Ablauf des Einwachsverhaltens unseres Patchsystems steht im Einklang mit den Ergebnissen bisher publizierter Studien zum histopathologischen Heilungsverlauf derzeit verfügbarer Verschlussysteme (Amin 1999 (A), Amin 2004, Sigler 2006a, Sigler 2006b, Sigler 2007, Foth 2009; Tab. 9).

Lokalisation	Implantationszeit		
	5 Tage	2-15 Monate	≥ 24 Monate
Oberflächlich	Fibrin	Endothelzellen	Endothelzellen
Pseudointima	Fibrin /Zellen	Zellen	Zellen
Gewebe innerhalb des Implantates	Fibrin	Fibrin /Zellen	Zellen

Tab.9: Einwachsverhalten von Amplatzer, Cardioseal und Star-Flex Systemen (aus Foth 2009).

Die zügige Neoendothelialisierung stellt einen wichtigen Beurteilungspunkt der Implantate dar, da ein kompletter Endothelüberzug einen antikoagulatorischen Effekt nach sich zieht und oberflächliche Thrombusbildung verhindern kann (Amin 1999 (A), Sigler 2005). Bisherige Versuche eines „pre-seeding“ der Implantate mit vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) oder Fibronectin zeigten enttäuschende Ergebnisse (Kong 2002, Sigler 2005). In der Klinik ist daher die 6-monatige antikoagulatorische Prophylaxe mit Aspirin gängige Praxis (Foth 2009). Entsprechend unseren Untersuchungen zur Biokompatibilität des Patchsystems dürfte dieser Prophylaxe-Zeitraum auch für unser Verschlussystem ausreichend sein.

Die Biokompatibilität und damit auch die Neoendothelialisierung werden des Weiteren maßgeblich von der Entzündungsreaktion beeinflusst, die lokal durch das Implantat ausgelöst wird. Auch um unser Hybrid-System bildete sich eine milde bis moderate Entzündungsreaktion aus. In den Präparaten nach 14 Tagen und drei Monaten fanden sich Lymphozyten und Fremdkörperriesenzellen vor allem im Bereich des Polyesterflickens. Fremdkörperriesenzellen, typischer Weise als körpereigene Reaktion auf textile Anteile der Verschlussysteme, fanden sich auch bei einigen anderen Studien zur Biokompatibilität (Amin 2004, Sigler 2005, Foth 2009). Es wird angenommen, dass diese Zellantwort Bestandteil des natürlichen Wundheilungsprozesses ist und in diesem Zusammenhang die Biokompatibilität der Implantate nicht herabsetzt (Sigler 2005). Die milde chronische Lymphozyteninfiltration ist ebenfalls aus vielen früheren Untersuchungen bekannt und unabhängig vom verwendeten Verschlussystem nachzuweisen (Sigler 2005, Siger 2007, Foth 2009). Nach Sigler et al. wäre diese Zellreaktion mit einem persistierenden inflammatorischen Stimulus vereinbar. Allerdings bleibt dessen Ursprung bei den guten histopathologischen Ergebnissen und der schnellen zellulären Integration der Verschlussysteme unklar. Eine Möglichkeit eines solchen Stimulus wäre die unter 4.4.1 schon erwähnte Nickel-Ionen-Freisetzung. Durch den TiO<sub>2</sub>-Mantel, den das Nitinolgeflecht während des Einwachsens ausbildet, verringert sich jedoch die Nickel-Freisetzung im Verlauf (Sigler 2005), so dass hier ein Rückgang der Lymphozytenreaktion zu erwarten wäre. Weiterführende histopathologische Untersuchungen sind hier nötig, um die Bedeutung und den klinischen Verlauf dieser zellulären Reaktionen im Langzeitverlauf zu beurteilen.

#### **4.5 Limitationen des neuartigen Verschlussystems**

Durch die Vorgaben der bayerischen Tierschutzkommission war in diesem chronischen Tiermodell ein „Ausheilen“ des artifiziellen VSDs vor Patchverschluss nicht möglich. Über die physiologische Entwicklung der artifiziell geschaffenen Defekte und einen etwaigen Spontanverschluss kann hier keine Aussage getroffen werden. Auch die Biokompatibilität unseres neuartigen Hybridsystems sollte an unversehrtem Septummyokard erneut geprüft werden, um gezielt zwischen den Entzündungsreaktionen durch die Kreation des mVSDs und den Reaktionen auf das Patchsystem selbst unterscheiden zu können. Die Vergleichbarkeit der Entzündungsreaktionen nach Implantation derartiger Verschlussysteme in Tiermodellen einerseits und im humanen Präparat andererseits, konnte bereits in einer Untersuchung von Sigler et. al 2007 nachgewiesen werden (Sigler 2007).



Durch die künstliche Schaffung der mVSDs ergibt sich eine weitere Limitation unserer Hybridtechnik: Am Tiermodell entsteht durch die runde Hohnadel des Stanzgerätes eine konstante, runde Form der mVSDs. Unter natürlichen Bedingungen ist allerdings eher eine variable und ovale Form der Defekte zu erwarten, die somit eine entsprechende Modifikation des Patchsystems notwendig machen würde.

Neben den Limitationen, die aus der Technik der VSD-Kreation selbst resultieren, haben auch Probleme der visuellen VSD-Darstellung zu Einschränkungen im Versuchsablauf geführt. Wie unter 4.2.3 bereits erwähnt stellt die Weiterentwicklung der bildgebenden Verfahren einen der Schlüsselpunkte des Erfolges der Hybridtherapie dar. Auch in der hier vorgelegten Studie ergaben sich durch die begrenzten Möglichkeiten der Visualisierung der intrakardialen Anatomie immer wieder Fehlerquellen. Zwei Fehlpositionierungen sind direkt auf unzureichende Qualität und Funktionalität der Bildgebung zurückzuführen. Wir gehen aber davon aus, dass durch die konsequente Weiterentwicklung der (3D)-Echokardiographie mit kleineren Sonden, verbesserter räumlicher Auflösung und abgestimmtem Zusammenspiel mit der Durchleuchtung gute technische Grundsteine gelegt werden, um das Potential der Hybridsysteme besser auszuschöpfen. Dies sollte anschließend in Langzeitstudien zu Hämodynamik und Biokompatibilität weiter evaluiert werden. Uns war es aus rechtlichen Gründen des Institutes nicht möglich, das Tiermodell über einen Beobachtungszeitraum von drei Monaten auszudehnen.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Mit der hier vorgelegten Studie gelang es uns, das bereits in Vorversuchen etablierte Tiermodell zur Schaffung von mVSDs und den Verschluss derselben mit einer neuartigen Hybridtechnik im Langzeitverlauf zu evaluieren. An 13 von 12 Tieren (92,3%) konnte erfolgreich ein künstlicher mVSD geschaffen werden. Zu 83,3% gelang es die Defekte mittels des innovativen Patchsystems über einen Hybridzugang ohne HLM zu verschließen. Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass die intervenierten Tiere auch während des dreimonatigen Beurteilungszeitraums ausgezeichnete kardiale Funktionsergebnisse in Stressechokardiographie und Kardio-MRT erzielten. Diese Ergebnisse stützen die guten Resultate der vorherigen Akutstudie und demonstrieren die respektable Funktionalität des Patchsystems im Langzeitverlauf. In den anschließenden makroskopischen und histopathologischen Untersuchungen fanden wir die verwendeten Polyesterpatches und Nitinolklammern in optimaler Position über den mVSDs und bereits von neugebildetem Endothel überzogen. In dieser ersten Studie der Literatur zur Biokompatibilität von Polyesterpatches konnten wir mit dem Nachweis der zeitgerechten Neoendothelialisierung und dem immunhistochemischen Nachweis von Fibroblasten und beginnender Neoangiogenese zufriedenstellende Resultate bezüglich des Einwachsverhaltens des Patchsystems erreichen.

Bei guter Reproduzierbarkeit unserer neuen Hybridtherapie besteht hinsichtlich des hierfür etablierten Tiermodells und der eigens für diese Verschlusstechnik entworfenen Prototypen ein großes Optimierungspotential. In zukünftigen Arbeiten, die eventuell an Tiermodellen mit natürlich vorkommenden mVSDs, unverletztem Septummyokard oder ausgeheilten künstlichen mVSDs durchgeführt werden können, werden die hier erhaltenen Ergebnisse zu den hämodynamischen Veränderungen und der Biokompatibilität erneut geprüft. Zusätzlich wären weitere Verbesserungen zur Minimierung der Invasivität der Technik wünschenswert. Aus operationstechnischen Gründen konnte in dieser Versuchsreihe noch keine (Mini-) Sternotomie durchgeführt werden, wie sie später als optimaler Zugang im Klinikalltag zum Gebrauch unserer neuen Hybridtechnik gedacht ist. Eventuell könnte sogar ein endoskopischer Zugang möglich werden. Mit der industriellen Entwicklung kleinerer Schleusendurchmesser (3 F) könnte das Risiko Klappenschäden zu verursachen noch mal verringert werden (erstmalig experimentell verwendet von Agnoletti et al. 2003). Auch an dem von uns verwendeten Klammernahtgerät werden noch weitere Modifikationen nötig sein um den technisch anspruchsvollen Abschnitt der korrekten Fixation zu vereinfachen. Zur Erhöhung der Verträglichkeit der verwendeten Klammern gibt es erste Untersuchungen einer Platin-Ummantelung des Nitinols, die jegliche Nickel-Freisetzung von Anfang an verhindert (Lertsapcharoen 2008). Denkbar wäre auch ein Ersatz der Nitinol-Klammern durch bioresorbierbare Äquivalente, z.B. Polylaktid-Anker. Einen hervorragenden Ansatz hierzu bietet der von Sideris et al. 2005 publizierte Versuch der endogenen Fibrinfixation, induziert durch einen Patch aus porösem Polyurethanschaum, durch das sich jegliches zusätzliches Befestigungsmaterial erübrigt (Sideris 2005). Eine weitere Möglichkeit die Biokompatibilität des Verschlusssystems zu erhöhen wäre die Verwendung von biodegradierbaren Patchmaterialien. Nahezu gänzlich ohne Metallanteil gefertigt könnten so allergene Komplikationen und chronische Fremdkörperreaktionen vermieden werden. Die Göttinger Arbeitsgruppe um Jux und Sigler et al. entwickelte bereits 2006 eine resorbierbare Bespannung des ASD/PFO-Starflex-Gerüsts, den sogenannten „Biostar-Sep-

talokkluder<sup>®</sup>“, der mittlerweile sowohl in Europa als auch in den USA für den klinischen Einsatz zugelassen wurde (Jux 2006, Mullen 2007, Hoehn 2010; Abb. 40).



Abb. 40: Biostar-Septalokkluder, gefertigt aus einer hochgereinigten, azellulären Typ-I-Kollagen- Matrix aus intestinaler Schweine-Submukosa, links ex-vivo Demonstration, rechts Neoendothelialisierung nach vier Wochen (Bilder der Arbeitsgruppe Jux/Sigler 2006)

Neben der Verwendung eines solchen porcinen Kollagenmaterials stellt auch bakteriell erzeugte Zellulose ein vielversprechendes Gewebe neuerer Verschlussysteme dar. Dieses Patchkonzept wird derzeit von unserer Arbeitsgruppe in einer ersten Langzeitstudie näher untersucht (Abb. 41)

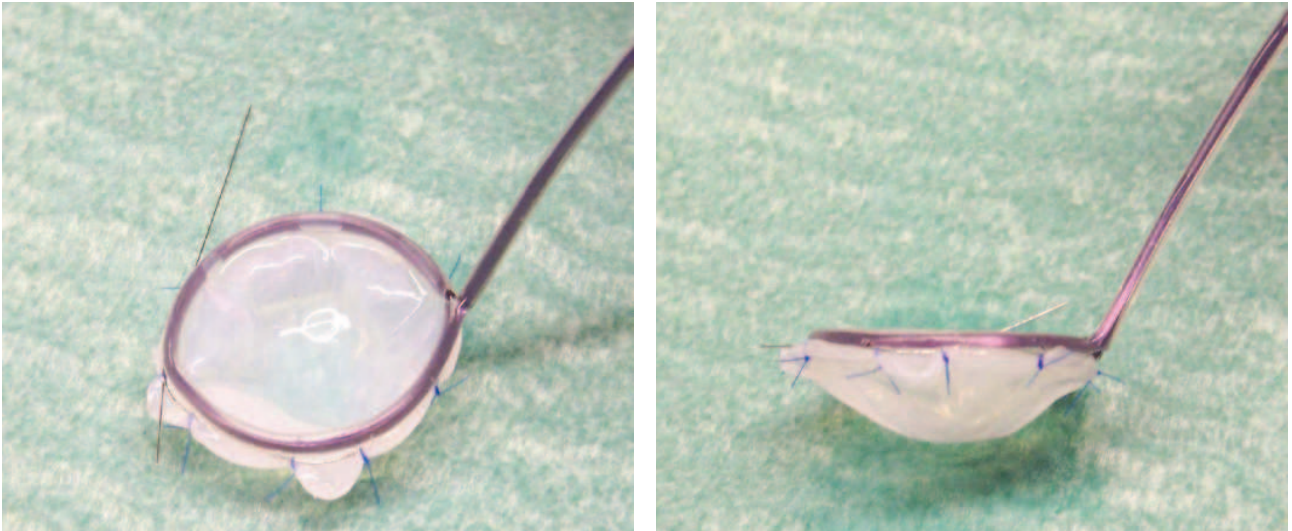


Abb 41: Prototyp eines bakteriell synthetisierten Zellulose-Patches unserer Arbeitsgruppe

Von entscheidender Bedeutung ist neben allen technischen Verbesserungen jedoch auch die gezielte Schulung aller Mitarbeiter des Teams. Routiniertere Arbeitsabläufe und eine kürzere „learning curve“ sind wichtig um zukünftige Versuchsreihen effektiv zu nutzen und die guten bisherigen Ergebnisse weiter zu verbessern. So könnte die junge Disziplin der Hybridtherapien angeborener Herzfehler mit dem großen Vorteil der Umgehung der HLM bald ein festes Standbein des therapeutischen Repertoires von Interventionisten und Herzchirurgen werden. Die Ergebnisse dieser Tierstudie zeigen vielversprechende neue Perspektiven für diese zukünftigen Therapiestrategien auf und sind ein Ansporn für unsere Arbeitsgruppe, die Weiterentwicklung unseres Hybrid-Patchsystems, hin zum klinischen Einsatz, gezielt fortzuführen.

## 6. Abstract

**OBJECTIVE:** Therapy for muscular ventricular septal defects beyond the moderator band, especially in neonates and infants, has always been challenging for both surgeons and cardiologists. Recently, we established a patch closure hybrid therapy for muscular ventricular septal defects. In this study, we evaluated it in a long-term porcine model.

**METHODS:** Thirteen minipigs underwent anterolateral thoracotomy to expose the left ventricle. Muscular ventricular septal defects were created under 2- and 3-dimensional echocardiographic guidance with a 7.5-mm sharp punch instrument. Closure of the defects was undertaken with our new patch system in hybrid technique. Animals were observed for 3 months. Echocardiographic evaluation and pathologic examination, including immunohistochemical staining, were undertaken.

**RESULTS:** Defects were successfully created in 12 pigs and closed in 10 pigs. Seven survived for 3 months. Residual shunting was noticed in 1 animal. Neither left ventricular dysfunction nor relevant damage to the valves could be detected. Pathologic examination showed complete endothelialization of the patch and the nitinol anchors without protruding parts of the system. Cellular organization was proceeding. Immunohistochemical staining demonstrated endothelial cells on the surface of the patch and fibromuscular cells around the patch.

**CONCLUSION:** Our hybrid therapy was efficacious in closing muscular ventricular septal defects without impairment of cardiac function. The patch system and nitinol anchors demonstrated good integration into the septum. Further development of the system for human application is already being undertaken.

## Auszüge dieser Arbeit wurden bisher veröffentlicht unter:

1. Kozlik-Feldmann R, Lang N, Lehner A, Sigler M, Schmitz C, Sodian R, Freudenthal F, Dalla Pozza R, Vasilyev NV, del Nido PJ, Netz H. Evaluation of a new hybrid technique for closure of muscular ventricular septal defects in a long term setting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Aug;138(2):365-73.
2. Kozlik-Feldmann R, Lang N, Aumann R, Lehner A, Rassoulain D, Sodian R, Schmitz C, Hinterseer M, Hinkel R, Thein E, Freudenthal F, Vasilyev NV, del Nido PJ, Netz H: Patch closure of muscular ventricular septal defects with a new hybrid therapy in a pig model. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Apr 22;51(16) : 1597-603.

---

## 7. Literaturverzeichnis

1. Agnoletti, G.; Boudjemline, Y.; Largen, E.; Aggoun, Y.; Szezepanski, I.; Bonnet, D.; Sidi, D. (2003): Use of 3 French catheters for diagnostic and interventional procedures in newborns and small infants. In: *Heart (British Cardiac Society)*, Jg. 89, H. 11, S. 1350–1351.
2. Aleem, Ilyas S.; Karamlou, Tara; Benson, Lee N.; McCrindle, Brian W. (2006): Transcatheter device versus surgical closure of ventricular septal defects: a clinical decision analysis. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 67, H. 4, S. 630–636.
3. Amin, Z.; Berry, J. M.; Foker, J. E.; Rocchini, A. P.; Bass, J. L. (1998): Intraoperative closure of muscular ventricular septal defect in a canine model and application of the technique in a baby. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 115, H. 6, S. 1374–1376.
4. Amin, Z.; Gu, X.; Berry, J. M.; Bass, J. L.; Titus, J. L.; Urness, M. et al. (1999 (A)): New device for closure of muscular ventricular septal defects in a canine model. In: *Circulation*, Jg. 100, H. 3, S. 320–328.
5. Amin, Z.; Gu, X.; Berry, J. M.; Titus, J. L.; Gidding, S. S.; Rocchini, A. P. (1999 (B)): Periventricular [correction of Periventricular] closure of ventricular septal defects without cardiopulmonary bypass. In: *The Annals of thoracic surgery*, Jg. 68, H. 1, S. 149-53; discussion 153-4.
6. Amin, Zahid; Danford, David A.; Lof, John; Duncan, Kim F.; Froemming, Stacey (2004): Intraoperative device closure of perimembranous ventricular septal defects without cardiopulmonary bypass: preliminary results with the periventricular technique. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 127, H. 1, S.234–241.
7. Amin, Zahid; Cao, Qi-Ling; Hijazi, Ziyad M. (2008): Closure of muscular ventricular septal defects: Transcatheter and hybrid techniques. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 72, H. 1, S. 102–111.
8. Anderson, R. H.; Lenox, C. C.; Zuberbuhler, J. R. (1984): The morphology of ventricular septal defects. In: *Perspectives in pediatric pathology*, Jg. 8, H. 3, S. 235– 268.

9. Anderson, R. H.; Wilcox, B. R. (1992): The surgical anatomy of ventricular septal defect. In: *Journal of cardiac surgery*, Jg. 7, H. 1, S. 17–35.
10. Arora, Ramesh; Trehan, Vijay; Kumar, Ashish; Kalra, G. S.; Nigam, Madhuri (2003): Transcatheter closure of congenital ventricular septal defects: experience with various devices. In: *Journal of interventional cardiology*, Jg. 16, H. 1, S. 83–91.
11. Bacha, Emile A.; Cao, Qi-Ling; Starr, Joanne P.; Waight, David; Ebeid, Makram R.; Hijazi, Ziyad M. (2003): Periventricular device closure of muscular ventricular septal defects on the beating heart: technique and results. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 126, H. 6, S. 1718–1723.
12. Bacha, E. A.; Hijazi, Z. M.; Cao, Q-L; Abdulla, R.; Starr, J. P.; Quinones, J. et al. (2005 (A)): Hybrid pediatric cardiac surgery. In: *Pediatric cardiology*, Jg. 26, H. 4, S. 315–322.
13. Bacha, E. A.; Cao, Q. L.; Galantowicz, M. E.; Cheatham, J. P.; Fleishman, C. E.; Weinstein, S. W. et al. (2005 (B)): Multicenter experience with periventricular device closure of muscular ventricular septal defects. In: *Pediatric cardiology*, Jg. 26, H. 2, S. 169–175.
14. Bacha, Emile A.; Marshall, Audrey C.; McElhinney, Doff B.; del Nido, Pedro J. (2007): Expanding the hybrid concept in congenital heart surgery. In: *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery. Pediatric cardiac surgery annual*, S. 146–150.
15. Ballweg, Jean A.; Wernovsky, Gil; Gaynor, J. William: Neurodevelopmental outcomes following congenital heart surgery. In: *Pediatric cardiology*, Jg. 28, H. 2, S. 126–133.
16. Barras, C. D.; Myers, K. A. (2000): Nitinol - its use in vascular surgery and other applications. In: *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, Jg. 19, H. 6, S. 564–569.
17. Bass, John L.; Kalra, G. S.; Arora, Ramesh; Masura, Jozef; Gavora, Pavlo; Thanopoulos, Basil D. et al. (2003): Initial human experience with the Amplatzer perimembranous ventricular septal occluder device. In: *Catheterization and cardiovascular interventions*, Jg. 58, H. 2, S. 238–245.
18. Batra, Maneesh; Heike, Carrie L.; Phillips, Richard C.; Weiss, Noel S. (2007): Geographic and occupational risk factors for ventricular septal defects: Washington State, 1987-2003. In: *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, Jg. 161, H. 1, S. 89–95.



19. Baumung, Albrecht (1983): Untersuchungen zum Wachstumsverlauf sowie zur alters- und masseabhängigen Schlachtung bei Rind und Schwein. Vorträge einer Arbeitstagung der Arbeitsgemeinschaft „Schlachtwert und Wachstumsphysiologie“; Dummerstorf-Rostock, 22.-24.6.1982. Forschungszentrum für Tierproduktion (Hg.). Berlin (Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der Deutschen Demokratischen Republik, 209).
20. Bauriedel, Gerhard; Skowasch, Dirk; Peuster, Matthias (2007): Pathology of explanted ASD occluder. In: *European heart journal*, Jg. 28, H. 6, S. 684.
21. Beghetti, Maurice; Galiè, Nazzareno (2009): Eisenmenger syndrome a clinical perspective in a new therapeutic era of pulmonary arterial hypertension. In: *Journal of the American College of Cardiology*, Jg. 53, H. 9, S. 733–740.
22. Beglinger, R.; Becker, M.; Eggenberger, E.; Lombard, C. (1975): [The Goettingen miniature swine as an experimental animal. 1. Review of literature, breeding and handling, cardiovascular parameters]. In: *Research in experimental medicine. Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie*, Jg. 165, H. 3, S. 251–263.
23. Bellinger, D. C.; Jonas, R. A.; Rappaport, L. A.; Wypij, D.; Wernovsky, G.; Kuban, K. C. et al. (1995): Developmental and neurologic status of children after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 332, H. 9, S. 549–555.
24. Bellinger, D. C.; Wypij, D.; Kuban, K. C.; Rappaport, L. A.; Hickey, P. R.; Wernovsky, G. et al. (1999): Developmental and neurological status of children at 4 years of age after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. In: *Circulation*, Jg. 100, H. 5, S. 526–532.
25. Bhati, B. S.; Nandakumaran, C. P.; Shatapathy, P.; John, S.; Cherian, G. (1972): Closure of patent ductus arteriosus during open-heart surgery. Surgical experience with different techniques. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 63, H. 5, S. 820–826.
26. Bjørnstad, Per G.; Smevik, Bjarne; Fischer, Gunther (2009): Catheter based closure of ventricular septal defects. In: *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ*, S. 1–6.

- 
27. Bloomfield, D. K. (1964): The Natural History Of Ventricular Septal Defect In Patients Surviving Infancy. In: *Circulation*, Jg. 29, S. 914–955.
  28. Bol-Raap, G.; Bogers, A. J. , Boersma H., Jong P. L. de, Hess J, Boss E. (1994): Temporary tricuspid valve detachment in closure of congenital ventricular septal defect. In: *European Journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association of Cardio-Thoracic Surgery*, Jg. 8, H. 3, S. 145-148.
  29. Butera, Gianfranco; Carminati, Mario; Chessa, Massimo; Piazza, Luciane; Abella, Raul; Negura, Diana Gabriella et al. (2006 (A)): Percutaneous closure of ventricular septal defects in children aged 12: early and mid-term results. In: *European heart journal*, Jg. 27, H. 23, S. 2889–2895.
  30. Butera, Gianfranco; Massimo, Chessa; Mario, Carminati (2006 (B)): Late complete atriovenous block after percutaneous closure of a perimembranous ventricular septal defect. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 67, H. 6, S. 938– 941.
  31. Butera, Gianfranco; Chessa, Massimo; Carminati, Mario (2007): Percutaneous closure of ventricular septal defects. In: *Cardiology in the young*, Jg. 17, H. 3, S. 243– 253.
  32. Carminati, Mario; Butera, Gianfranco; Chessa, Massimo; Giovanni, Joseph de; Fisher, Gunter; Gewillig, Marc et al. (2007): Transcatheter closure of congenital ventricular septal defects: results of the European Registry. In: *European heart journal*, Jg. 28, H. 19, S. 2361–2368. Online verfügbar unter doi:10.1093/eurheartj/ehm314.
  33. Chaturvedi, R. R.; Shore, D. F.; Yacoub, M.; Redington, A. N. (1996): Intraoperative apical ventricular septal defect closure using a modified Rashkind double umbrella. In: *Heart (British Cardiac Society)*, Jg. 76, H. 4, S. 367–369.
  34. Chessa, Massimo; Carminati, Mario; Butera, Gianfranco; Bini, Roberta Margherita; Drago, Manuela; Rosti, Luca et al. (2002 (A)): Early and late complications associated with transcatheter occlusion of secundum atrial septal defect. In: *Journal of the American College of Cardiology*, Jg. 39, H. 6, S. 1061–1065.
  35. Chessa, Massimo; Carminati, Mario; Cao, Qi-Ling; Butera, Gianfranco; Giusti, Sandra; Bini, Roberta Margherita; Hijazi, Ziyad M. (2002 (B)): Transcatheter closure of congenital and acquired muscular ventricular septal defects using the Amplatzer device. In: *The Journal of invasive*
-

- cardiology, Jg. 14, H. 6, S. 322–327.
36. Chessa, Massimo; Butera, Gianfranco; Negura, Diana; Bussadori, Claudio; Giamberti, Alessandro; Fesslova, Vlasta; Carminati, Mario (2008): Transcatheter closure of congenital ventricular septal defects in adult: mid-term results and complications. In: *International journal of cardiology*, Jg. 133, H. 1, S. 70–73.
37. Chessa, Massimo; Dua, Jaspal S.; Carminati, Mario (2009): Transcatheter closure of congenital ventricular septal defects in adults Mid-term results and complications: Few more considerations. In: *International journal of cardiology*.
38. Contreras-Ramos, A.; Sánchez-Gómez, C.; Fierro-Pastrana, R.; González- Márquez, H.; Acosta-Vazquez, F.; Arellano-Galindo, J. (2009): Normal development of the muscular region of the interventricular septum. II. The importance of myocardial proliferation. In: *Anatomia, histologia, embryologia*, Jg. 38, H. 3, S. 219–228.
39. Crossland, D. S.; Wilkinson, J. L.; Cochrane, A. D.; d'Udekem, Y.; Brizard, C. P.; Lane, G. K. (2008): Initial results of primary device closure of large muscular ventricular septal defects in early infancy using perventricular access. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 72, H. 3, S. 386–391.
40. Dalrymple, J. (1847): Diseased Heart in which the root of the Aorta had an opening common to the two ventricles. In: *Trans Path Soc Lond*, H. 1, S. 58.
41. Dasika, Uday K.; Kanter, Kirk R.; Vincent, Robert (2003): Nickel allergy to the percutaneous patent foramen ovale occluder and subsequent systemic nickel allergy. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 126, H. 6, S. 2112.
42. Deja, M. A.; Szostek, J.; Widenka, K.; Szafron, B.; Spyt, T. J.; Hickey, M. S.; Sosnowski, A. W. (2000): Post infarction ventricular septal defect - can we do better? In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, Jg. 18, H. 2, S. 194–201.
43. Diab, Karim A.; Hijazi, Ziyad M.; Cao, Qi-Ling; Bacha, Emile A. (2005): A truly hybrid approach to perventricular closure of multiple muscular ventricular septal defects. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 130, H. 3, S. 892– 893.
44. Diab, Karim A.; Cao, Qi-Ling; Bacha, Emile A.; Hijazi, Ziyad M. (2007 (A)): Device

- closure of atrial septal defects with the Amplatzer septal occluder: safety and outcome in infants. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 134, H. 4, S. 960–966.
45. Diab, Karim A.; Cao, Qi-Ling; Hijazi, Ziyad M. (2007 (B)): Device closure of congenital ventricular septal defects. In: *Congenital heart disease*, Jg. 2, H. 2, S. 92– 103.
46. Diab, Karim A.; Cao, Qi-Ling; Mora, Bassem N.; Hijazi, Ziyad M. (2007 (C)): Device closure of muscular ventricular septal defects in infants less than one year of age using the Amplatzer devices: feasibility and outcome. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 70, H. 1, S. 90–97.
47. Ding, Zhong-Ru; Qin, Yong-Wen; Hu, Jian-Qiang; Zhao, Xian-Xian; Yang, Zhi-Hong; Hong-Wu; Cao, Jiang (2009): A new pan-nitinol occluder for transcatheter closure of ventricular septal defects in a canine model. In: *Journal of interventional cardiology*, Jg. 22, H. 2, S. 191–198.
48. Dodge-Khatami, Ali; Knirsch, Walter; Tomaske, Maren; Prêtre, René; Bettex, Dominique; Rousson, Valentin; Bauersfeld, Urs (2007): Spontaneous closure of small residual ventricular septal defects after surgical repair. In: *The Annals of thoracic surgery*, Jg. 83, H. 3, S. 902–905.
49. Edmunds, L. Henry (2004): Cardiopulmonary bypass after 50 years. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 351, H. 16, S. 1603–1606.
50. Ehrnrooth, Minna; Kerosuo, Heidi (2009): Face and neck dermatitis from a stainless steel orthodontic appliance. In: *The Angle orthodontist*, Jg. 79, H. 6, S. 1194– 1196.
51. Ewert P, Kretschmar O. (2004): Interventioneller Verschluss angeborener Ventrikelseptumdefekte. Breitere Indikationsstellung dank neuerer Implantate. In: *Z Kardiologie*, H. 93, S. 147–155.
52. Fishberger, S. B.; Bridges, N. D.; Keane, J. F.; Hanley, F. L.; Jonas, R. A.; Mayer, J. E. et al. (1993): Intraoperative device closure of ventricular septal defects. In: *Circulation*, Jg. 88, H. 5 Pt 2, S. II205-9.
53. Foo, Thomas K. F.; Wolff, Steven D.; Gupta, Sandeep N.; Kraitichman, Dara L. (2005): Enhanced viability imaging: improved contrast in myocardial delayed enhancement using dual inversion time subtraction. In: *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic*

- Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine, Jg. 53, H. 6, S. 1484–1489.
54. Foth, Rudi; Quentin, Thomas; Michel-Behnke, Ina; Vogt, Manfred; Kriebel, Thomas; Kreischer, Anne et al. (2009): Immunohistochemical characterization of neotissues and tissue reactions to septal defect-occlusion devices. In: *Circulation. Cardiovascular interventions*, Jg. 2, H. 2, S. 90–96.
55. Franco, Diego; Meilhac, Sigolène M.; Christoffels, Vincent M.; Kispert, Andreas; Buckingham, Margaret; Kelly, Robert G. (2006): Left and right ventricular contributions to the formation of the interventricular septum in the mouse heart. In: *Developmental biology*, Jg. 294, H. 2, S. 366–375.
56. Fu, Yun-Ching; Bass, John; Amin, Zahid; Radtke, Wolfgang; Cheatham, John P.; Hellenbrand, William E. et al. (2006): Transcatheter closure of perimembranous ventricular septal defects using the new Amplatzer membranous VSD occluder: results of the U.S. phase I trial. In: *Journal of the American College of Cardiology*, Jg. 47, H. 2, S. 319–325.
57. Fukahara, Kazuaki; Minami, Kazutomoto; Reiss, Nils; Fassbender, Dieter; Koerfer, Reiner (2003): Systemic allergic reaction to the percutaneous patent foramen ovale occluder. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 125, H. 1, S. 213–214.
58. Gall, F., Cooley D.A.: Isolated ventricular septal defects. Anatomy, physiology, clinical aspects and surgical treatment. In: *Langenbecks Archiv für klinische Chirurgie*, Jg. 297, S. 259–324
59. Gessler, Peter; Schmitt, Bernhard; Prêtre, Rene; Latal, Beatrice (2009): Inflammatory response and neurodevelopmental outcome after open-heart surgery in children. In: *Pediatric cardiology*, Jg. 30, H. 3, S. 301–305.
60. Geva, T.; Powell, A. J.; Crawford, E. C.; Chung, T.; Colan, S. D. (1998): Evaluation of regional differences in right ventricular systolic function by acoustic quantification echocardiography and cine magnetic resonance imaging. In: *Circulation*, Jg. 98, H. 4, S. 339–345.
61. Glodek, Peter; Oldigs, Benno; Becker, Max (1981): *Das Göttinger Miniaturschwein*. Berlin: Parey (Schriftenreihe Versuchstierkunde, 7).
62. Gordon, Brent M.; Moore, John W. (2009): Nickel for your thoughts: Survey of the Congenital

- Cardiovascular Interventional Study Consortium (CCISC) for nickel allergy. In: *The Journal of invasive cardiology*, Jg. 21, H. 7, S. 326–329.
63. Gu, X.; Han, Y. M.; Titus, J. L.; Amin, Z.; Berry, J. M.; Kong, H. et al. (2000): Transcatheter closure of membranous ventricular septal defects with a new nitinol prosthesis in a natural swine model. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 50, H. 4, S. 502–509.
64. Hanna B, Colan SD Bridges ND Mayer JE Castaneda A. (1999): Clinical and myocardial atatus after left ventriculotomy for ventricular septal defect closure. In: *Journal of the American College of Cardiology*, H. 17, S. 110A.
65. Harris, Matthew A.; Johnson, Tiffanie R.; Weinberg, Paul M.; Fogel, Mark A. (2007): Delayed-enhancement cardiovascular magnetic resonance identifies fibrous tissue in children after surgery for congenital heart disease. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 133, H. 3, S. 676–681.
66. Hein, Ralph; Büscheck, Franziska; Fischer, Evelyn; Leetz, Michaela; Bayard, Margareth Taaffe Yves; Ostermayer, Stefan et al. (2005): Atrial and ventricular septal defects can safely be closed by percutaneous intervention. In: *Journal of interventional cardiology*, Jg. 18, H. 6, S. 515–522.
67. Helmcke, F.; Souza, A. de; Nanda, N. C.; Villacosta, I.; Gatewood, R.; Colvin, E.; Soto, B. (1989): Two-dimensional and color Doppler assessment of ventricular septal defect of congenital origin. In: *The American journal of cardiology*, Jg. 63, H. 15, S. 1112–1116.
68. Hijazi, Z. M.; Hakim, F.; Al-Fadley, F.; Abdelhamid, J.; Cao, Q. L. (2000): Transcatheter closure of single muscular ventricular septal defects using the amplatzer muscular VSD occluder: initial results and technical considerations. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 49, H. 2, S. 167–172.
69. Hisagi, Motoyuki; Suematsu, Yoshihiro; Masuzawa, Akihiro; Ono, Minoru; Motomura, Noboru; Takamoto, Shinich (2009): Image-guided surgical repair of ventricular septal rupture using self-expanding device. In: *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, Jg. 8, H. 6, S. 602–605.
70. Hjortdal, V. E.; Redington, A. N.; Leval, M. R. de; Tsang, V. T. (2002): Hybrid approaches to com-

- plex congenital cardiac surgery. In: *European journal of cardiothoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, Jg. 22, H. 6, S. 885–890.
71. Hoch M., Roemer U. Kozlik-Feldmann R. Fuchs A. Netz H. (2002): Threedimensional echocardiography of ventricular septal defects. In: *Images Pediatr Cardiol*, H. 12, S. 4–20.
72. Hoehn, Rene; Hesse, Carola; Ince, Hüseyin; Peuster, Matthias (2010): First experience with the BioSTAR-device for various applications in pediatric patients with congenital heart disease. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 75, H. 1, S. 72–77.
73. Holzer, Ralf; Hijazi, Ziyad M. (2004 (A)): Interventional approach to congenital heart disease. In: *Current opinion in cardiology*, Jg. 19, H. 2, S. 84–90.
74. Holzer, Ralf; Balzer, David; Cao, Qi-Ling; Lock, Ken; Hijazi, Ziyad M. (2004 (B)): Device closure of muscular ventricular septal defects using the Amplatzer muscular ventricular septal defect occluder: immediate and mid-term results of a U.S. registry. In: *Journal of the American College of Cardiology*, Jg. 43, H. 7, S. 1257– 1263.
75. Holzer, Ralf; Giovanni, Jo de; Walsh, Kevin P.; Tometzki, Andrew; Goh, Th; Hakim, Fakhri et al. (2006): Transcatheter closure of perimembranous ventricular septal defects using the amplatzer membranous VSD occluder: immediate and midterm results of an international registry. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 68, H. 4, S. 620–628.
76. Hu HB, Jiang SL, Xu ZY, Huang LJ, Zhao SH, Zhen H: Transcatheter closure of perimembranous ventricular septal defects by a new Amplatzer membranous ventricular septal defect occluder: A single center study in Beijing. In: *Chinese Medical Journal (Engl)*; Jg. 121 H. 6, S. 573-576
77. Hunold, P.; Kreitner, K-F; Barkhausen, J. (2007): „Dead or alive?“: how and why myocardial viability imaging by cardiac MRI works. In: *RöFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin*, Jg. 179, H. 10, S. 1016–1024.
78. Jacobs JP, Burke RP, Quintessenza JA, Mavroudis C (2000): Congenital heart surgery nomenclatur and and database project: ventricular septal defect. In: *Annals of toracic surgery*, Jg. 65, S. 25-35

- 
79. Jux, Christian; Bertram, Harald; Wohlsein, Peter; Bruegmann, Michael; Paul, Thomas (2006): Interventional atrial septal defect closure using a totally bioresorbable occluder matrix: development and preclinical evaluation of the BioSTAR device. In: *Journal of the American College of Cardiology*, Jg. 48, H. 1, S. 161–169.
80. Kalra, G. S.; Verma, P. K.; Dhall, A.; Singh, S.; Arora, R. (1999): Transcatheter device closure of ventricular septal defects: immediate results and intermediate-term follow-up. In: *American heart journal*, Jg. 138, H. 2 Pt 1, S. 339–344.
81. Kanerva, L.; Sipiläinen-Malm, T.; Estlander, T.; Zitting, A.; Jolanki, R.; Tarvainen, K. (1994): Nickel release from metals, and a case of allergic contact dermatitis from stainless steel. In: *Contact dermatitis*, Jg. 31, H. 5, S. 299–303.
82. Kardon, R. E.; Cao, Q. L.; Masani, N.; Sugeng, L.; Supran, S.; Warner, K. G. et al. (1998): New insights and observations in three-dimensional echocardiographic visualization of ventricular septal defects: experimental and clinical studies. In: *Circulation*, Jg. 98, H. 13, S. 1307–1314.
83. Kim, Kye Hun; Park, Jong Chun; Yoon, Nam Sik; Moon, Jae Youn; Hong, Young Joon; Park, Hyung Wook et al. (2008): A case of allergic contact dermatitis following transcatheter closure of patent ductus arteriosus using Amplatzer ductal occluder. In: *International journal of cardiology*, Jg. 127, H. 2, S. e98-9.
84. Kim, R. J.; Fieno, D. S.; Parrish, T. B.; Harris, K.; Chen, E. L.; Simonetti, O. et al. (1999): Relationship of MRI delayed contrast enhancement to irreversible injury, infarct age, and contractile function. In: *Circulation*, Jg. 100, H. 19, S. 1992–2002.
85. King; de Moor M (1999): Ventricular Septal Defect. In: *Current treatment options in cardiovascular medicine*, Jg. 1, H. 4, S. 311–322.
86. King, Jennifer C.; Moskowitz, Ivan P. G.; Burgon, Patrick G.; Ahmad, Ferhaan; Stone, James R.; Seidman, Jonathan G.; Lees, Jacqueline A. (2008): E2F3 plays an essential role in cardiac development and function. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, Jg. 7, H. 23, S. 3775–3780.
87. Kleijn, S. A.; Kamp, O. (2009): Clinical application of three-dimensional echocardiography: past, present and future. In: *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*, Jg. 17,
-



---

H. 1, S. 18–24.

88. Kong, Xiangqing; Grabitz, R. G.; van Oeveren, W.; Klee, D.; van Kooten, T. G.; Freudenthal, F. et al. (2002): Effect of biologically active coating on biocompatibility of Nitinol devices designed for the closure of intra-atrial communications. In: *Biomaterials*, Jg. 23, H. 8, S. 1775–1783.
89. Kozlik-Feldmann, R.; Lang, N.; Sodian, R.; Aumann, R.; Rassoulia, D.; Hinterseer, M. et al. (2008 (A)): Creation of ventricular septal defects on the beating heart in a new pig model. In: *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes*, Jg. 40, H. 3, S. 297–303.
90. Kozlik-Feldmann, Rainer; Lang, Nora; Aumann, Regine; Lehner, Anja; Rassoulia, Darius; Sodian, Ralf et al. (2008 (B)): Patch closure of muscular ventricular septal defects with a new hybrid therapy in a pig model. In: *Journal of the American College of Cardiology*, Jg. 51, H. 16, S. 1597–1603.
91. Kozlik-Feldmann, Rainer; Lang, Nora; Lehner, Anja; Sigler, Matthias; Schmitz, Christoph; Sodian, Ralf et al. (2009): Evaluation of a new hybrid technique for closure of muscular ventricular septal defects in a long-term setting. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 138, H. 2, S. 365–373.
92. Kreutzer, J.; Ryan, C. A.; Gauvreau, K.; van Praagh, R.; Anderson, J. M.; Jenkins, K. J. (2001): Healing response to the Clamshell device for closure of intracardiac defects in humans. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 54, H. 1, S. 101–111.
93. Krumsdorf, Ulrike; Ostermayer, Stefan; Billinger, Kai; Trepels, Thomas; Zadan, Elisabeth; Horvath, Kathrin; Sievert, Horst (2004): Incidence and clinical course of thrombus formation on atrial septal defect and patient foramen ovale closure devices in 1,000 consecutive patients. In: *Journal of the American College of Cardiology*, Jg. 43, H. 2, S. 302–309.
94. Kuhn, M. A.; Latson, L. A.; Cheatham, J. P.; McManus, B.; Anderson, J. M.; Kilzer, K. L.; Furst, J. (1996): Biological response to Bard Clamshell Septal Occluders in the canine heart. In: *Circulation*, Jg. 93, H. 7, S. 1459–1463.
95. Kuribayashi, R.; Sekine, S.; Aida, H.; Seki, K.; Meguro, A.; Shibata, Y. et al. (1994): Long-term

results of primary closure for ventricular septal defects in the first year of life. In: *Surgery today*, Jg. 24, H. 5, S. 389–392.

96. Lai, Dominic W.; Saver, Jeffrey L.; Araujo, Jesus A.; Reidl, Marc; Tobis, Jonathan (2005): Pericarditis associated with nickel hypersensitivity to the Amplatzer occluder device: a case report. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 66, H. 3, S. 424–426.
97. Lang, Gudrun (2006): *Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*: Springer Wien.
98. Lapp, Harald; Krakau, Ingo (2009): *Das Herzkatheterbuch. Diagnostische und interventionelle Kathetertechniken - mit DVD*: Thieme Verlag.
99. Lertsapcharoen, Pornthep; Khongphatthanayothin, Apichai; Srimahachota, Suphot; Leelanukrom, Ruenreong (2008): Self-expanding platinum-coated nitinol devices for transcatheter closure of atrial septal defect: prevention of nickel release. In: *The Journal of invasive cardiology*, Jg. 20, H. 6, S. 279–283.
100. Liu, Jin-Cheng; Zhang, Jin-Zhou; Li, Qiang; Wang, Wen; Zhu, Hailong; Chen, Tao et al. (2008): Is left ventriculotomy feasible for muscular ventricular septal defects in infants? In: *The heart surgery forum*, Jg. 11, H. 2, S. 78-81
101. Lillehei CW, Cohen M, Warden HE, et al. (1955): The results of direct vision closure of ventricular septal defects in eight patients by means of controlled cross circulation. In: *Surg Gynecol Obstet.*,101(4):446–66.
102. Lock, J. E.; Block, P. C.; McKay, R. G.; Baim, D. S.; Keane, J. F. (1988): Transcatheter closure of ventricular septal defects. In: *Circulation*, Jg. 78, H. 2, S. 361–368.
103. Lodato, Joseph A.; Cao, Qi Ling; Weinert, Lynn; Sugeng, Lissa; Lopez, John; Lang, Roberto M.; Hijazi, Ziyad M. (2009): Feasibility of real-time threedimensional transoesophageal echocardiography for guidance of percutaneous atrial septal defect closure. In: *European journal of echocardiography : the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology*, Jg. 10, H. 4, S. 543–548.
104. McElhinney, Doff B.; Driscoll, Deborah A.; Levin, Elissa R.; Jawad, Abbas F.; Emanuel, Beverly

- S.; Goldmuntz, Elizabeth (2003): Chromosome 22q11 deletion in patients with ventricular septal defect: frequency and associated cardiovascular anomalies.  
In: *Pediatrics*, Jg. 112, H. 6 Pt 1, S. e472.
105. Meguro A, Kuribayashi R, Sakurada T, Aida H, Abe T (1992): Intravascular hemolysis due to residual shunt after patch closure of VSD: a case report. In: *Kyobu Geka*, Jg. 45, H. 6, S. 537-540.
106. Michel-Behnke, Ina; Le, Trong-Phi; Waldecker, Bernd; Akintuerk, Hakan; Valeske, Klaus; Schranz, Dietmar (2005): Percutaneous closure of congenital and acquired ventricular septal defects--considerations on selection of the occlusion device. In: *Journal of interventional cardiology*, Jg. 18, H. 2, S. 89-99.
107. Mills, N. L.; King, T. D. (1976): Nonoperative closure of left-to-right shunts.  
In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 72, H. 3, S. 371-378.
108. Mills, Noel L.; King, Terry D. (2003): Late follow-up of nonoperative closure of secundum atrial septal defects using the King-Mills double-umbrella device. In: *The American journal of cardiology*, Jg. 92, H. 3, S. 353-355.
109. Minette MS, Sahn D. J. (2006): Ventricular septal defects. In: *Circulation*, H. 114, S. 2190-2197.
110. Moe, D. G.; Guntheroth, W. G. (1987): Spontaneous closure of uncomplicated ventricular septal defect. In: *The American journal of cardiology*, Jg. 60, H. 8, S. 674- 678.
111. Moons, Philip; Sluysmans, Thierry; Wolf, Daniel de; Massin, Martial; Suys, Bert; Benatar, Abraham; Gewillig, Marc (2009): Congenital heart disease in 111 225 births in Belgium: birth prevalence, treatment and survival in the 21st century. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, Jg. 98, H. 3, S. 472-477.
112. Mullen, Michael J.; Devellian, Carol A.; Jux, Christian (2007): BioSTAR bioabsorbable septal repair implant. In: *Expert review of medical devices*, Jg. 4, H. 6, S. 781-792.
113. Murzi, B.; Bonanomi, G. L.; Giusti, S.; Luisi, V. S.; Bernabei, M.; Carminati, M.; Vanini, V. (1997): Surgical closure of muscular ventricular septal defects using double umbrella devices (intraoperative VSD device closure). In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardiothoracic Surgery*, Jg. 12, H. 3, S. 450-4; discussion 454-5.

- 
114. Naqvi, Tasneem Z. (2004): Recent advances in echocardiography. In: Expert review of cardiovascular therapy, Jg. 2, H. 1, S. 89–96.
115. Nora, J. J.; Nora, A. H. (1988): Update on counseling the family with a first-degree relative with a congenital heart defect. In: American journal of medical genetics, Jg. 29, H. 1, S. 137–142.
116. Novotny, Paul M.; Stoll, Jeff A.; Vasilyev, Nikolay V.; del Nido, Pedro J.; Dupont, Pierre E.; Zickler, Todd E.; Howe, Robert D. (2007): GPU based realtime instrument tracking with three-dimensional ultrasound. In: Medical image analysis, Jg. 11, H. 5, S. 458–464.
117. Okubo, M.; Benson, L. N.; Nykanen, D.; Azakie, A.; van Arsdell, G.; Coles, J.; Williams, W. G. (2001): Outcomes of intraoperative device closure of muscular ventricular septal defects. In: The Annals of thoracic surgery, Jg. 72, H. 2, S. 416–423.
118. O’Rahilly, Ronan; Müller, Fabiola (2001): Human embryology & teratology. 3. ed. New York: Wiley-Liss.
119. Pacileo, G.; Pisacane, C.; Russo, M. G.; Zingale, F.; Auricchio, U.; Vosa, C.; Calabrò, R. (1998): Left ventricular mechanics after closure of ventricular septal defect: influence of size of the defect and age at surgical repair. In: Cardiology in the young, Jg. 8, H. 3, S. 320–328.
120. Padalino, M. A.; Stellin, G.; Testolin, L.; Neirrotti, R. A. (2000): Surgical treatment of apical muscular ventricular septal defects. In: European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, Jg. 18, H. 4, S. 500–501.
121. Park, Myung K. (2007): Pediatric Cardiology for Practitioners: Elsevier Health Sciences.
122. Pedra CA, Pedra SR, Esteves CA, Pontes SC jr, Braga SL, Arrieta SR, Santana MV, Fontes VF, Masura J (2004): Percutaneous closure of perimembranous ventricular septal defects with the Amplatzer device: technical and morphological considerations. In: Catheterization and cardiovascular interventions, Jg. 61, H.3, S. 403-410
123. Perk, Gila; Lang, Roberto M.; Garcia-Fernandez, Miguel Angel; Lodato, Joe; Sugeng, Lissa; Lopez, John et al. (2009): Use of real time three-dimensional transesophageal echocardiography in intracardiac catheter based interventions. In: Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography, Jg. 22, H. 8, S. 865–882.
-

- 
124. Phillips, A. B. M.; Green, J.; Bergdall, V.; Yu, J.; Monreal, G.; Gerhardt, M. et al. (2009): Teaching the „hybrid approach“: a novel swine model of muscular ventricular septal defect. In: *Pediatric cardiology*, Jg. 30, H. 2, S. 114–118.
125. Porstmann, W.; Wierny, L.; Warnke, H. (1967): Closure of persistent ductus arteriosus without thoracotomy. In: *German medical monthly*, Jg. 12, H. 6, S. 259– 261.
126. Prakash, Ashwin; Powell, Andrew J.; Krishnamurthy, Rajesh; Geva, Tal (2004): Magnetic resonance imaging evaluation of myocardial perfusion and viability in congenital and acquired pediatric heart disease. In: *The American journal of cardiology*, Jg. 93, H. 5, S. 657–661.
127. Predescu, Dragos; Chaturvedi, Rajiv R.; Friedberg, Mark K.; Benson, Lee N.; Ozawa, Akira; Lee, Kyong-Jin (2008): Complete heart block associated with device closure of perimembranous ventricular septal defects. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 136, H. 5, S. 1223–1228.
128. Prêtre, R.; Benedikt, P.; Turina, M. I. (1999): Modified approach to close multiple apical ventricular septal defects. In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, Jg. 16, H. 6, S. 683–685.
129. Qi, Xin; Yang, Guan; Yang, Leilei; Lan, Yu; Weng, Tujun; Wang, Jian et al. (2007): Essential role of Smad4 in maintaining cardiomyocyte proliferation during murine embryonic heart development. In: *Developmental biology*, Jg. 311, H. 1, S. 136–146.
130. Quentin, Thomas; Poppe, Andrea; Bär, Karin; Sigler, Albrecht; Foth, Rudi; Michel-Behnke, Ina et al. (2009): A novel method for processing resin-embedded specimens with metal implants for immunohistochemical labelling. In: *Acta histochemica*, Jg. 111, H. 6, S. 538–542.
131. Rajagopal, Satish K.; Ma, Qing; Obler, Dita; Shen, Jie; Manichaikul, Ani; Tomita-Mitchell, Aoy et al. (2007): Spectrum of heart disease associated with murine and human GATA4 mutation. In: *Journal of molecular and cellular cardiology*, Jg. 43, H. 6, S. 677–685.
132. Rao, P. S. (1983): Further observations on the spontaneous closure of physiologically advantageous ventricular septal defects in tricuspid atresia: surgical implications. In: *The Annals of thoracic surgery*, Jg. 35, H. 2, S. 121–131.
-

- 
133. Ramaciotti, Claudio, Vetter Jane M., Bornemeier Renee A., Chin, Alvin J. (1995): American Journal of Cardiology, Jg 70, H. 1. , S. 61-65
134. Rashkind, W. J.; Miller, W. W. (1966): Creation of an atrial septal defect without thoracotomy. A palliative approach to complete transposition of the great arteries. In: JAMA : the journal of the American Medical Association, Jg. 196, H. 11, S. 991–992.
135. Reamon-Buettner, Stella Marie; Ciribilli, Yari; Traverso, Ilaria; Kuhls, Beate; Inga, Alberto; Borlak, Juergen (2009): A functional genetic study identifies HAND1 mutations in septation defects of the human heart. In: Human molecular genetics.
136. Rehwald, Wolfgang G.; Fieno, David S.; Chen, Enn-Ling; Kim, Raymond J.; Judd, Robert M. (2002): Myocardial magnetic resonance imaging contrast agent concentrations after reversible and irreversible ischemic injury. In: Circulation, Jg. 105, H. 2, S. 224–229.
137. Ries, Marcus W.; Kampmann, Christoph; Rupprecht, Hans-Jürgen; Hintereder, Gudrun; Hafner, Gerd; Meyer, Jürgen (2003): Nickel release after implantation of the Amplatzer occluder. In: American heart journal, Jg. 145, H. 4, S. 737–741.
138. Rigatelli, Gianluca; Cardaioli, Paolo; Giordan, Massimo; Aggio, Silvio; Chinaglia, Mauro; Braggion, Gabriele; Roncon, Loris (2007): Nickel allergy in interatrial shunt device-based closure patients. In: Congenital heart disease, Jg. 2, H. 6, S. 416–420.
139. Roger, H. (1879): Recherches Cliniques sur la communication congénitale des deux coeurs, par inoclusion du septum interventriculaire. In: Bull. de l' Acad. de Méd., H. 8, S. 1074–1189.
140. Roguin, N.; Du, Z. D.; Barak, M.; Nasser, N.; Hershkowitz, S.; Milgram, E. (1995): High prevalence of muscular ventricular septal defect in neonates. In: Journal of the American College of Cardiology, Jg. 26, H. 6, S. 1545–1548.
141. Rokitansky, C. Fr von (1875): Die Defekte der Scheidewände des Herzens. Herausgegeben von W. Braunmüller. Wien. (Pathol Anat Abhdlg).
142. Roos-Hesselink, J. W.; Meijboom, F. J.; Spitaels, S. E. C.; van Domburg, R.; van Rijen, E. H. M.; Utens, E. M. W. J. et al. (2004): Outcome of patients after surgical closure of ventricular septal defect at young age: longitudinal follow-up of 22-34 years. In: European heart journal, Jg. 25, H. 12, S. 1057–1062.
-

- 
143. Roussin, R.; Serraf, A.; Bruniaux, J.; Lacour-Gayet, F.; Sousa Uva, M.; Planché, C. (1996): [Surgical treatment of isolated multiple ventricular septal defects. apropos of a series of 175 consecutive cases]. In: Archives des maladies du coeur et des vaisseaux, Jg. 89, H. 5, S. 571–577.
144. RUBIO-ALVAREZ, V.; LIMON, R.; SONI, J. (1953): [Intracardiac valvulotomy by means of a catheter.]. In: Archivos del Instituto de Cardiología de México, Jg. 23, H. 2, S. 183–192.
145. Sadler, Thomas W. (2003): Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen: Thieme, Stuttgart.
146. Sambraus, Hans H. (2001): Farbatlas der Nutztierassen. 250 Rassen in Wort und Bild: Ulmer Verlag.
147. Scheuerman, Oded; Bruckheimer, Elchanan; Marcus, Nufar; Hoffer, Vered; Garty, Ben-Zion (2006): Endocarditis after closure of ventricular septal defect by transcatheter device. In: Pediatrics, Jg. 117, H. 6, S. e1256-8.
148. Schmitz, Christoph; Esmailzadeh, Bahman; Herberg, Ulrike; Lang, Nora; Sodian, Ralf; Kozlik-Feldmann, Rainer et al. (2008): Hybrid procedures can reduce the risk of congenital cardiovascular surgery. In: European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, Jg. 34, H. 4, S. 718–725.
149. Schott, J. J.; Benson, D. W.; Basson, C. T.; Pease, W.; Silberbach, G. M.; Moak, J. P. et al. (1998): Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. In: Science (New York, N.Y.), Jg. 281, H. 5373, S. 108–111.
150. Schumacher, Gebhard; Hess, John; Bühlmeier, Konrad (2008): Klinische Kinderkardiologie: Springer.
151. Shann, Kenneth G.; Giacomuzzi, Carmen R.; Harness, Lynn; Myers, Gerard J.; Paugh, Theron A.; Mellas, Nicholas et al. (2008): Complications relating to perfusion and extracorporeal circulation associated with the treatment of patients with congenital cardiac disease: consensus definitions from the Multi-Societal Database Committee for Pediatric and Congenital Heart Disease. In: Cardiology in the young, Jg. 18 Suppl 2, S.
-

---

206–214.

152. Sherman, Jonathan M.; Hagler, Donald J.; Cetta, Frank (2004): Thrombosis after septal closure device placement: a review of the current literature. In: *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, Jg. 63, H. 4, S. 486–489.
153. Shirali, G. S.; Smith, E. O.; Geva, T. (1995): Quantitation of echocardiographic predictors of outcome in infants with isolated ventricular septal defect. In: *American heart journal*, Jg. 130, H. 6, S. 1228–1235.
154. Sideris, Eleftherios B.; Macuil, Benjamin; Varvarenko, Victor; Toumanides, Savvas (2005): Transcatheter patch occlusion of perimembranous ventricular septal defects. In: *The American journal of cardiology*, Jg. 95, H. 12, S. 1518–1521.
155. Sigler, M.; Handt, S.; Seghaye, M. C.; Bernuth, G. von; Grabitz, R. G. (2000): Evaluation of in vivo biocompatibility of different devices for interventional closure of the patent ductus arteriosus in an animal model. In: *Heart (British Cardiac Society)*, Jg. 83, H. 5, S. 570–573.
156. Sigler, M.; Kriebel, T.; Wilson, N. (2006b): Histological confirmation of complete endothelialisation of a surgically removed Amplatzer ASD occluder. In: *Heart (British Cardiac Society)*, Jg. 92, H. 12, S. 1723.
157. Sigler, M.; Paul, T.; Grabitz, R. G. (2005): Biocompatibility screening in cardiovascular implants. In: *Zeitschrift für Kardiologie*, Jg. 94, H. 6, S. 383–391.
158. Sigler, Matthias; Jux, Christian (2007): Biocompatibility of septal defect closure devices. In: *Heart (British Cardiac Society)*, Jg. 93, H. 4, S. 444–449.
159. Sigler, Matthias; Jux, Christian; Ewert, Peter (2006a): Histopathological workup of an Amplatzer atrial septal defect occluder after surgical removal. In: *Pediatric cardiology*, Jg. 27, H. 6, S. 775–776.
160. Singh, Harinder R.; Turner, Daniel R.; Forbes, Thomas J. (2004): Nickel allergy and the amplatzer septal occluder. In: *The Journal of invasive cardiology*, Jg. 16, H. 11, S. 681–682.
161. Singh, Raghuvir; Dahotre, Narendra B. (2007): Corrosion degradation and prevention by surface



- modification of biometallic materials. In: *Journal of materials science. Materials in medicine*, Jg. 18, H. 5, S. 725–751.
162. Soto B, Becker AE, Moulart AJ, Lie JT, Anderson RH (1980): Classification of ventricular septal defects. In: *Br Heart J*, H. 43, S. 332–343.
163. Stoll, C.; Alembik, Y.; Roth, M. P.; Dott, B.; Geeter, B. de (1989): Risk factors in congenital heart disease. In: *European journal of epidemiology*, Jg. 5, H. 3, S. 382–391.
164. Stubhan, Miriam; Markert, Michael; Mayer, Karin; Trautmann, Thomas; Klumpp, Anja; Henke, Julia; Guth, Brian (2008): Evaluation of cardiovascular and ECG parameters in the normal, freely moving Göttingen Minipig. In: *Journal of pharmacological and toxicological methods*, Jg. 57, H. 3, S. 202–211.
165. Suematsu, Yoshihiro; Martinez, Joseph F.; Wolf, Benjamin K.; Marx, Gerald R.; Stoll, Jeffrey A.; Dupont, Pierre E. et al. (2005): Three-dimensional echo-guided beating heart surgery without cardiopulmonary bypass: atrial septal defect closure in a swine model. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 130, H. 5, S. 1348–1357.
166. Swindle, M. M.; Thompson, R. P.; Carabello, B. A.; Smith, A. C.; Hepburn, B. J.; Bodison, D. R. et al. (1990): Heritable ventricular septal defect in Yucatan miniature swine. In: *Laboratory animal science*, Jg. 40, H. 2, S. 155–161.
167. Thanopoulos BD, Tsaousis GS, Konstatapoulou GN, Zarayelyan AG (1999): Transcatheter closure of muscular ventricular septal defects with the Amplatzer ventricular septal defect occluder: Initial clinical applications in children. In: *Journal of the American College of Cardiology*, Jg. 33, H. 5, S. 1395–1399.
168. Thanopoulos BD, Tsaousis GS, Karanasios G, Eleftherakis NG, Paphitis C (2003): Transcatheter closure of perimembranous ventricular septal defects with the Amplatzer asymmetric ventricular septal occluder: preliminary experience in children. In: *Heart (British Cardiac Society)*, Jg. 89, H. 8, S. 918–922.
169. Thanopoulos, B. D. (2005 (A)): Catheter Closure of Congenital Muscular Ventricular Septal Defects. In: *Pediatric cardiology*, H. 26, S. 220–223.
170. Thanopoulos, B. D.; Rigby, M. L. (2005 (B)): Outcome of transcatheter closure of muscular ven-

- tricular septal defects with the Amplatzer ventricular septal defect occluder. In: *Heart (British Cardiac Society)*, Jg. 91, H. 4, S. 513–516.
171. Tikkanen, J.; Heinonen, O. P. (1991): Risk factors for ventricular septal defect in Finland. In: *Public health*, Jg. 105, H. 2, S. 99–112.
172. Tofeig, M.; Patel, R. G.; Walsh, K. P. (1999): Transcatheter closure of a midmuscular ventricular septal defect with an amplatzer VSD occluder device. In: *Heart (British Cardiac Society)*, Jg. 81, H. 4, S. 438–440.
173. Van den Bosch, Annemien E.; Harkel, Derk-Jan ten; McGhie, Jackie S.; Roos- Hesselink, Jolien W.; Simoons, Maarten L.; Bogers, Ad J. J. C.; Meijboom, Folkert J. (2006): Feasibility and accuracy of real-time 3-dimensional echocardiographic assessment of ventricular septal defects. In: *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*, Jg. 19, H. 1, S. 7–13.
174. van Praagh, R.; Geva, T.; Kreutzer, J. (1989): Ventricular septal defects: how shall we describe, name and classify them? In: *Journal of the American College of Cardiology*, Jg. 14, H. 5, S. 1298–1299.
175. Vasilyev, Nikolay V.; Martinez, Joseph E.; Freudenthal, Franz P.; Suematsu, Yoshihiro; Marx, Gerald R.; del Nido, Pedro J. (2006): Three-dimensional echo and videocardioscopy-guided atrial septal defect closure. In: *The Annals of thoracic surgery*, Jg. 82, H. 4, S. 1322-6; discussion 1326.
176. Vasilyev, Nikolay V.; Melnychenko, Ivan; Kitahori, Kazuo; Freudenthal, Franz P.; Phillips, Alistair; Kozlik-Feldmann, Rainer et al. (2008): Beating-heart patch closure of muscular ventricular septal defects under real-time three-dimensional echocardiographic guidance: a preclinical study. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, Jg. 135, H. 3, S. 603–609.
177. Vincent, Robert N.; Raviele, Anthony A.; Diehl, Helen J. (2003): Single-center experience with the HELEX septal occluder for closure of atrial septal defects in children. In: *Journal of interventional cardiology*, Jg. 16, H. 1, S. 79–82.
178. Vogt, Manfred Otto; Kühn, Andreas; Hörer, Jürgen; Schreiber, Christian; Schneider, Heike; Foth, Rudi et al. (2009): Clinical, echocardiographic and histopathologic findings in nine patients with surgically explanted ASD/PFO devices: Do we know enough about the healing process in humans? In: *International journal of cardiology*.

- 
179. Wahl, A.; Meier, B. (2009): Patent foramen ovale and ventricular septal defect closure. In: Heart (British Cardiac Society), Jg. 95, H. 1, S. 70–82.
180. Wang, Binbin; Li, Lin; Xie, Xiaodong; Wang, Jing; Yan, Jinting; Mu, Yuan; Ma, Xu (2009): Genetic variation of SAL-Like 4 (SALL4) in ventricular septal defect. In: International journal of cardiology.
181. Wang, Zhen J.; Reddy, Gautham P.; Gotway, Michael B.; Yeh, Benjamin M.; Higgins, Charles B. (2003): Cardiovascular shunts: MR imaging evaluation. In: Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc, Jg. 23 Spec No, S. S181-94.
182. Westaby, Stephen (Hg.) (1994): Landmarks in Cardiac Surgery: Blackwell Science Ltd.
183. Wildhirt, S. M.; Tárnok, A. (2001): Immune consequences, pathophysiology, and current perspectives of the extracorporeal circulation. In: Shock (Augusta, Ga.), Jg. 16 Suppl 1, S. 1–2.
184. Wollenek, G.; Wyse, R.; Sullivan, I.; Elliott, M.; Leval, M. de; Stark, J. (1996): Closure of muscular ventricular septal defects through a left ventriculotomy. In: European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, Jg. 10, H. 8, S. 595–598.
185. Wypij, David; Newburger, Jane W.; Rappaport, Leonard A.; duPlessis, Adre J.; Jonas, Richard A.; Wernovsky, Gil et al. (2003): The effect of duration of deep hypothermic circulatory arrest in infant heart surgery on late neurodevelopment: The Boston Circulatory Arrest Trial. In: The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, Jg. 126, H. 5, S. 1397–1403.
186. Xunmin C, Shisen J, Jianbin G, Haidong W, Lijun W (2007): Comparison of results and complications of surgical and Amplatzer device closure of perimembranous ventricular septal defects. In: International Journal of Cardiology, Jg. 120, H. 1, 28-31.
187. Yalonetsky, Sergey; Lorber, Abraham (2009): Late high degree atrioventricular block after percutaneous closure of a perimembranous ventricular septal defect. In: Cardiology in the young, Jg. 19, H. 3, S. 298–300.
188. Yang SG, Novello R, Nicolson S, Steven J, Gaynor JW, Spray TL, Rychik J (2000): Evaluation of ventricular septal defect repair using intraoperative transesophageal echocardiography: frequency and significance of residual defects in infants and children. In: Echocardiography, Jg. 17, H. 7, S. 681- 684.
-

189. Zheng, Qijun; Zhao, Zhijing; Zuo, Jian; Yang, Jian; Wang, Hongbing; Yu, Shiqiang; Yi, Dinghua (2009): A comparative study: Early results and complications of percutaneous and surgical closure of ventricular septal defect. In: *Cardiology*, Jg. 114, H. 4, S. 238–243.

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Einteilung der VSDs nach Anderson (aus Jacobs 2000)
- Abb. 2: Einteilung der VSDs nach Van Praagh (aus Jacobs 2000)
- Abb. 3: Links: Mills-Kings' „Double-umbrella-device“; Rechts: Postmortem Photographie eines von Endothel überwachsenen Systems (aus Mills et al. 2003)
- Abb. 4: Verschiedene Schirmsysteme, die zur Therapie des VSDs eingesetzt wurden: A, Rashkind Doppelschirm; B, Sideris „Buttoned System“; C und D, „Clamshell-System“, später in „Cardioseal“ umbenannt (Bilder der Arbeitsgruppe Hijazi 2001)
- Abb. 5: Amplatzer Systeme, die bisher für den Verschluss von VSDs genutzt wurden.  
Abb. 5.1: Kommerziell erhältliche Amplatzer Verschlussysteme; Okkluder für A) ASDs; B) PDA; C) mVSDs;  
Abb. 5.2: Prototypen neuer Bauart: D) konzentrischer Okkluder; E)/F) exzentrische Okkluder (Bilder der Arbeitsgruppe Hijazi 2001)
- Abb. 6: Pfm-Nit-Occluder. A) und B) Nit-Occlud-VSD-Spiralen mit eingewebten synthetischen Fasern für den schnelleren Verschluss durch erhöhte Thrombogenität; C) Nit-Occlud-PDA-Device (Abbildungen der Firma Pfm AG, Köln)
- Abb. 7: Prototyp des Patchverschlussystems aus der Publikation des Bostoner Kooperations-teams 2006, hier in der ex-vivo Demonstration
- Abb. 8: MVSD-Verschluss mit zweifacher linksventrikulärer Inzision nach der Methode von Vasilyev 2008
- Abb. 9: Hystereseschleife des Nitinols aus Barras 2000)
- Abb. 10: Göttingen Minipig® ( Abbildung der Firma Ellegard, Dänemark)
- Abb. 11: Wachstumskurve des Göttingen Minipigs® (Abbildung der Firma Ellegard, Dänemark)
- Abb. 12: Stanzgerät zur Schaffung der mVSDs (Trokar, Hohlneedle und roter Verschlussstopfen)
- Abb. 13: Das Patchsystem

- Abb. 14: Das Klammerapplikationsgerät mit Nitinolklammern
- Abb. 15: Schleusenzugänge am Hals des Tieres
- Abb. 16: Operationssitus linkslateral auf Höhe des 4. ICR
- Abb. 17: TEE-Sonden- bzw. Drainagezugang
- Abb. 18: Tabaksbeutelnaht am schlagenden Herzen
- Abb. 19: Einsetzen der Sonderanfertigung zum Defektstechen
- Abb. 20: Setzen des Defektes mit der Hohlnadel
- Abb. 21: Befestigung des Patches
- Abb. 22: In-vitro Demonstration der Patchfixierung mittels Nitinolklammern und Ablösen des Trägerrahmens
- Abb. 23: Erfolgreich therapiertes Versuchstier zwei Wochen postoperativ
- Abb. 24: Darstellung der Avidin-Biotin-Enzymkomplex-Methode (ABC-Methode) zur immunhistochemischen Färbung der Präparate
- Abb. 25: SSFP-Cine-MRT-Untersuchung zur Evaluation der Myokardkontraktion in Diastole (A) und Systole (B), die weißen Pfeile kennzeichnen den Patchbereich; C: Contrast-Enhanced-MRT-Untersuchung zur Vitalitätsdiagnostik, die schwarzen Pfeile kennzeichnen die fleckige Kontrastmittelanreicherung („patchy enhancement“) im Patchbereich.
- Abb. 26: Mittlerer arterieller Blutdruck der Tiere während des Eingriffs: 1 = Basismessung, Hautschnitt; 2 = Stanzen des Ventrikelseptumdefektes; 3 = Positionierung des Patchsystems; 4 = Fixierung des Patchsystems mit Nitinolklammern.
- Abb. 27: Entwicklung der pulmonal-arteriellen Druckwerte (schwarz) und pulmonal-kapillären Verschlussdruckwerte (grau) während des follow-ups: VD = vor Defekt, ND = nach Defekt, NV = nach Verschluss, NU = Nachuntersuchung nach 1 Monat, AU = Abschlussuntersuchung nach 3 Monaten.

- Abb. 28: Ausgestanzter mVSD direkt nach Intervention; A: Übersichtsaufnahme B: gezielte Vergrößerung des mVSDs.
- Abb. 29: Makroskopische Beurteilung des Integrationsverhaltens des Patches; A: Erster Fibrinbelag nach drei Tagen; B: Endothelialisierung nach 14 Tagen.
- Abb. 30: Minimaler Rest-VSD bei Tier 3 mit einliegender Sonde.
- Abb. 31: Der Patch ist nach drei Monaten komplett von Neoendothel überwachsen und kaum noch vom umgebenden Myokard abzugrenzen.
- Abb. 32: Drei Stunden nach Ausstanzen des mVSDs. Rechts: Substanzdefekt mit Fibrinbelag an den Defekträndern. Links: Hämorrhagische Infiltration des Myokardgewebes.
- Abb. 33: 3 Tage nach Patchverschluss: Fibrinkondensation mit integrierten Erythrozytenresten besonders im Bereich des Polyesterpatches (grau). Links ein Überblick, rechts ein vergrößerter Ausschnitt des Patchbereiches.
- Abb. 34: 14 Tage nach Patchimplantation. Links: Ansätze von Neoendothel auf dem Patch (grau) und um die Nitinol-Klammern (schwarz). Rechts in Vergrößerung das beginnende Einwachsen fibromuskulärer Zellen.
- Abb. 35: 3 Monate nach Patchimplantation. Links: Komplette Neoendothelialisierung des Patches mit fortschreitender zellulärer Organisation des Septums. Rechts: Vergrößerung.
- Abb. 36: Rechts Mikroskopie: Inflammatorische Reaktion mit Lymphozyten und Fremdkörperriesenzellen in der Umgebung der Patchstrukturen. Links: Fremdkörperriesenzellen in der immunhistochemischen Untersuchung.
- Abb. 37: Immunhistochemische Färbungen. Links: SMA-Färbung mit Darstellung fibromuskulärer Zellen (braun). Mitte: Die vim-Färbung zeigt fibromuskuläre Zellen (braun) um den Patch. Rechts: Die vWF-Färbung zeigt Endothelzellen auf dem Patch.
- Abb. 38: Die Elektronenmikroskopie drei Monate nach Implantation zeigt die komplette Neoendothelialisierung des Patches.

- Abb. 37: Links AVSDO in situ aus Bacha 2005, dazu im Vergleich rechts das planare Patchsystem von Kozlik-Feldmann et al.
- Abb. 38: Biostar-Septalokkluder, gefertigt aus einer hochgereinigten, azellulären Typ-I-Kollagen-Matrix aus intestinaler Schweine-Submukosa, links ex-vivo Demonstration, rechts Neoendothelialisierung nach vier Wochen (Bilder der Arbeitsgruppe Jux/Sigler 2006).
- Abb. 39: Prototyp eines biodegradierbaren Zellulose-Patches unserer Arbeitsgruppe.



---

## 9. Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Arbeiten zum VSD-Verschluss bis 2000 mit variablen Verschlusssystemen (Arbeitsgruppe Hijazi 2001); cAVB = kompletter AV-Block, LSB = Linksschenkelblock.
- Tab. 2: Protokoll des chronischen Versuchsablaufes
- Tab. 3: Vergleich der Shuntgrößen vor und nach Patchverschluss des VSDs (\*,signifikant).
- Tab. 4: Individueller Verlauf der einzelnen VSD-Modelle (\*: erfolgreicher Verschluss des Defektes; ◦: Tier durchlief alle Versuchsphasen; †: Tier verstarb vorzeitig).
- Tab. 5: §, Kein Restshunt; ‡, keine Pathologie; TI, Trikuspidalklappeninsuffizienz; MI, Mitralklappeninsuffizienz; AI, Aortenklappeninsuffizienz; PI, Pulmonalklappeninsuffizienz;
- Tab. 6: „Fractional-Shortening“ (FS) unter Dobutamin während der Nachuntersuchung (NU) und Abschlussehokardiographie (AU).
- Tab. 7: Hämodynamische Daten während der mVSD-Verschlüsse. mVSD = muskulärer Ventrikelseptumdefekt, MAP = mittlerer arterieller Druck, CVP = zentralvenöser Druck, PAP syst. = systolischer pulmonalarterieller Druck, PCWP = pulmonalkapilläre Wedgedruckmessung; \* signifikant.
- Tab. 8: Hämodynamische Daten während des follow-ups.: mVSD = muskulärer Ventrikelseptumdefekt, MAP = mittlerer arterieller Druck, ZVP = zentralvenöser Druck, PAP syst. = systolischer pulmonalarterieller Druck, PCWP = pulmonalkapilläre Wedgedruckmessung.
- Tab. 9: Einwachsverhalten von Amplatzer, Cardioseal und Star-Flex Systemen (aus Foth 2009).

## 10. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Anja Lehner, erkläre an Eides statt, daß ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Etablierung eines neuen Patchsystems zum Verschluss muskulärer Ventrikelseptumdefekte im chronischen Schweinemodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

## 11. Danksagung

*„Mit einer Hand allein lässt sich kein Knoten knüpfen“, sagt ein altes mongolisches Sprichwort.*

In diesem Sinne möchte ich mich insbesondere bei Herrn Professor Dr. Dr. h.c. H. Netz als Leiter der Abteilung für Kinderkardiologie und Pädiatrische Intensivmedizin bedanken, ohne dessen großartige wissenschaftliche und organisatorische Unterstützung der Aufbau dieser Arbeitsgruppe und Ablauf der Studien zwischen dem täglichen Klinikalltag nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt auch meiner kinderkardiologisch-kinderherzchirurgischen Arbeitsgruppe, allen voran Herrn PD Dr. Kozlik-Feldmann mit der initialen Idee und dem unermüdlichen wissenschaftlichen Engagement, die dieses Projekt zusammen mit dem großartigen Erfindergeist von Herrn Dr. Franz Freudenthal Wirklichkeit werden ließen. Ein herzliches Dankeschön an dieser Stelle an unsere bolivianischen Kooperationspartner im Kardiozentrum La Paz.

Frau Dr. Nora Lang als Herz und Motor der Arbeitsgruppe danke ich für das herausragende Engagement, die großartige Motivation und das unerschütterliche Vertrauen in meine Arbeit, das nötige Quentchen trockenen Humor und die vielen Stückchen Schokolade, die uns durch allerlei widrige Versuchsbedingungen und so manche nächtliche Überstunde gerettet haben. Eine bessere Betreuung meiner Doktorarbeit hätte ich mir nicht wünschen können.

Auch bei meinen Mitdotorandinnen Regine Aumann, Franziska Fuchs, Anja Meyer, Elena Merkel und Ruth Thalmann möchte ich mich an dieser Stelle bedanken. Sie haben mich in der Organisation der Versuche und der Betreuung der Tiere stets unterstützt und die die Arbeitsgruppe um eine große Portion an Spaß und gute Laune bereichert.

Den chirurgischen Kollegen unserer „Hybrid-Arbeitsgruppe“ danke ich für die großartige Zusammenarbeit, Engagement und Geduld neben dem täglichen vollen Operationsprogramm. Besonderer Dank gilt hier Herrn PD Dr. Schmitz, dessen erfahrene chirurgische Sicht der Dinge zu vielen wertvollen Impulsen geführt hat und für das Gelingen der Experimente essentiell war.

Herrn Dr. Eckart Thein und Frau Dr. Rabea Hinkel danke ich für die tiermedizinische Unterstützung und die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge zur Durchführung einer solch aufwendigen Tierstudie.

Mit dem letzten und wertvollsten Satz dieser Arbeit möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern, Helga und Richard Lehner danken, die stets an mich geglaubt haben und deren vollster Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte.

## 12. Lebenslauf

