
**In-vitro Evaluation einer neu entwickelten bio-hybriden
tissue-engineerten Aortenklappenprothese
zur TAVI-Applikation**



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

vorgelegt von
Jang-Sun Lee

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik,
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Christian Hagl

**In-vitro Evaluation einer neu entwickelten
bio-hybriden tissue-engineerten Aortenklappenprothese zur
TAVI-Applikation**

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

vorgelegt von
Jang-Sun Lee

aus
Suweon, Republic of Korea
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Hagl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Georg Nollert

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Nikolas Thierfelder
Dr. -Ing. Bassil Akra

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2018

Inhaltsverzeichnis

1. KURZZUSAMMENFASSUNG.....	4
2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
3. EINLEITUNG.....	10
4. MEDIZINISCHER HINTERGRUND	13
4.1 Das Herz des Menschen	13
4.2 Herzklappen.....	15
4.2.1 Makroskopische Anatomie und Funktion	15
4.2.2 Mikroskopische Anatomie und Funktion.....	16
4.2.3 Herzklappenerkrankungen.....	17
4.2.4 Therapie der Herzklappenerkrankungen.....	19
4.2.5 Herzklappenprothesen.....	22
4.3 Tissue Engineering.....	25
4.3.1 Hintergrund.....	25
4.3.2 Zellquelle.....	26
4.3.3 Zellträger (Scaffold).....	27
4.3.4 Bioreaktor.....	29
5. MATERIAL UND METHODEN	31
5.1 Zellkultur.....	31
5.1.1 Zell-Isolation und Zellkultur.....	31
5.1.2 Passagieren der Zellen	34
5.1.3 Lagerung der Zellen	36
5.2 Herstellung der Aortenklappenprothese.....	36
5.2.1 Auftauen der Homografts	37
5.2.3 Dezellularisation.....	38
5.2.4 Fixierung der Prothesen.....	38
5.2.5 Beschichtung und statische Kultivierung	39

5.3 Präkonditionierung, TAVI-Simulation und Perfusion	41
5.3.1 Präkonditionierung.....	41
5.3.2 TAVI-Simulation	42
5.3.3 Perfusion.....	43
6. ANALYSE.....	45
6.1. Endoskopische Aufnahme	45
6.2. Rasterelektronenmikroskopie	45
6.2.1 Allgemeines.....	45
6.2.2 Fixieren.....	46
6.2.3 Dehydrieren.....	47
6.2.4 Kritisch-Punkt-Trocknen	47
6.2.5 Sputtern.....	47
6.2.6 REM-Aufnahme	48
6.3. Immunhistochemie.....	48
6.3.1. Allgemeines.....	48
6.3.2. Zellkultur	49
6.3.3. Vorbereitung der histologischen Proben.....	50
6.3.4. Paraffinschnitte.....	50
6.5 Live/Dead Färbung®	52
7. ERGEBNISSE.....	53
7.1. Funktionalität der SBAP	53
7.2. Rasterelektronenmikroskopie	54
7.2.1. Dezellularisation.....	54
7.2.2. Beschichtung und Konditionierung	56
7.2.3. TAVI-Prozedur und Perfusion	56
7.3. Immunhistochemie.....	58
7.3.1. Zellkultur	58
7.2.2. Nachweis der Zellbeschichtung	60
6.2.3. Nachweis der extrazellulären Matrix	63
7.2.4. Zytoskelett und Interzelluläre Verbindung	65
7.2.5. Immunmodulatorische Reaktion.....	67
7.2.6. Überblick der tabellarischen Zusammenfassung.....	68

7.4. Zellvitalität.....	69
8. DISKUSSION	70
9. ZUSAMMENFASSUNG	75
10. LITERATURVERZEICHNIS.....	77
11. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	84
12. TABELLENVERZEICHNIS.....	86
13. ANHANG	87
DANKSAGUNG.....	96
VERÖFFENTLICHUNG.....	98

1. Kurzzusammenfassung

Hintergrund und Zielsetzung

Mit transkatheter Aortenklappenprothesen (TAVR) lassen sich heutzutage Herzklappenerkrankungen behandeln. Diese Studie betrachtet besiedelte, konditionierte und perfundierte biohybride Aortenklappenprothesen. Zur Herstellung wurden sie dezellularisiert und gestentet. Eine Katheterimplantation wird nach der Konditionierung simuliert.

Material und Methoden

Aus Venensegmenten wurden Fibroblasten (FB) und Endothelzellen (EC) gewonnen und kultiviert. Biohybride Aortenklappenprothesen (BAP; n = 6) sind aus dezellularisierten Homograftsegeln und einer Polyurethanwand hergestellt und in einen Co-Cr-Stent genäht worden. Anschließend wurden sie mit FB und danach mit EC (jeweils 7.5×10^5 Zellen/cm²) beschichtet. Die anschließende Konditionierung (500 ml/min) umfasste fünf Tage, einhergehend mit einer TAVI-Simulation. Die BAP wurden schließlich für zwei Tage perfundiert (1100 ml/min). In den Phasen der Konditionierung und Perfusion erfolgte eine endoskopische Dokumentation. Proben wurden vor und nach jedem Versuchsschritt entnommen. Die Rasterelektronenmikroskopie (REM), immunzytochemische (ICC) und immunhistochemische Färbungen (IHC) sowie die Live/Dead-Färbung[®] sind zur Analyse herangezogen worden.

Ergebnisse

Nach der Besiedelung und Konditionierung ließ sich eine konfluente Zellschicht im REM nachweisen. Die Anwesenheit von EC und FB konnte mithilfe der IHC-Färbungen gegen CD-31 und TE-7 bestätigt werden. Es bildeten sich interzelluläre Verbindungen und eine extrazelluläre Matrix. Speziell nach der Konditionierung ist dieser Fall gegeben. Nach dem Crimpen zeigten sich in der Live-/Dead-Färbung[®] deutlich tote Zellen. Mithilfe der REM-Untersuchung ließen sich beschädigte Stellen in der Zellschicht erkennen. Außerdem ist es zu

einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion gekommen. Diese ließ sich mittels IHC gegen ICAM nach der Perfusion beobachten. Eine adäquate Funktion der Prothesen konnte während der Perfusion endoskopisch dokumentiert werden. Es waren keine Anzeichen einer Insuffizienz nachweisbar.

Zusammenfassung

Das biohybride Scaffold ist ein effektiv besiedelbarer Zellträger. Das Crimpen zelltragender TE-TAVRs ist zu überdenken. Hierbei kann es zu einer massiven Zellschädigung kommen.

2. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
%	Prozent
A	
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Aminoethylcarbazol
AK	Antikörper
AKE	Aortenklappenersatz
AS	Aortenstenose
AV-Klappe	Atrioventrikularklappe
B	
BAP	Biohybrid Aortenklappenprothese
BAV	biohybrid aortic valves
BHKP	Biologische Herzklappenprothesen
C	
CD-31	cluster of differentiation-31
CGM	Zellen-Wachstumsmedium
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Co-Cr-Stent	Cobalt-Chromium-Stent
CTE	Kardiales Tissue Engineering, Cardiac Tissue Engineering
D	
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid

Abkürzung	Bedeutung
<i>E</i>	
EC	Endothelzellen, endothelial cells
ECM	Extrazellulär Matrix, extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGM	Endothelzellen-Wachstumsmedium
ESC	embryonale Stammzellen
<i>F</i>	
FB	Fibroblasten, Fibroblasts
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FGM	Fibroblasten Wachstumsmedium
<i>G</i>	
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAGs	Glykosaminoglykane
<i>H</i>	
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
<i>I</i>	
IC	Interstitielle Zellen
ICAM	intercellular adhesion molecule
ICC	Immunzytochemie, Immunocytochemistry
IHC	Immunhistochemie, Immunhistochemistry
<i>K</i>	
KBR	Konditionierungsbioreaktor
<i>L</i>	
L	Liter

Abkürzung	Bedeutung
M	
M199	Medium 199
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minuten
MHKP	Mechanische Herzklappenprothesen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mPa	Megapascal
m/s	Meter pro Sekunde
N	
Na-CaCO	Natrium Calciumcarbonat
NOAK	Neue Orale Antikoagulantien
nM	Nanomol
P	
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCL	Polycaprolactone
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PESC	Postembryonale Stammzellen
PGA	polyglycolic acid
PLA	polylactic acid
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PU	Polyurethane

Abkürzung	Bedeutung
R	
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur
S	
sAVR	surgical aortic valve replacement
SBAP	Gestented Biohybrid Aortenklappenprothese
SEM	scanning electron microscopy
SMC	Glatte Muskelzellen, smooth muscle cell
Std	Stunde
T	
TAVI	Trankatheter Aortenklappen Implantation, Transcatheter Aortic Valve Implantation
TAVR	Trankatheter Aortenklappenersatz, Transcatheter Aortic Valve Replacement
TE	Tissue Engineering
TE-7	Thymic epithelial antibody
TEHK	Tissue-engineerte Herzklappen
TE-TAVR	Tissue-engineerte transkatheter Aortenklappenprothesen
V	
VE-Cadherin	Vascular endothelial Cadherin
μ	
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
μm	Mikrometer

3. Einleitung

Eine Aortenstenose, die medizinisch unbehandelt bleibt, geht im Vergleich zu anderen Herzklappenerkrankungen vor allem im hohen Lebensalter mit einer signifikant höheren Morbidität und Mortalität einher [1]. Der Aortenklappenersatz eignet sich bei einer symptomatisch hochgradigen Aortenstenose [2]. Zahlen belegen, dass sich heutzutage jährlich mehr als 15.000 Patienten weltweit bei einem chirurgischen Eingriff die Aortenklappe (sAVR: surgical Aortic Valve Replacement) ersetzen lassen [3]. Bei der sAVR kommt noch immer die Sternotomie zur Anwendung. Auch die Kardioplegie sowie Herz-Lungen-Maschine wird dabei verwendet. Insbesondere für multimorbide Patienten gilt die sAVR als ungeeignet [4]. Die Zahl der intraoperativen Todesfälle ist hier sehr hoch. Ebenfalls kann es zu schweren postoperativen Komplikationen kommen [5]. Diese Probleme lassen sich durch das kathetergestützte Aortenklappenersatz-Verfahren (TAVI: Transcatheter Aortic Valve Implantation) vermeiden. In diesem Fall handelt es sich um eine minimalinvasive Behandlung. Dieses Verfahren wurde im Jahr 2002 durch Alain Cribier erstmals erfolgreich an einem Menschen durchgeführt [6]. Danach erfolgte die schrittweise Weiterentwicklung dieser Methode. Die Implantationsanzahl ist über die Jahre kontinuierlich angestiegen. Bei der TAVI ist die Erfolgsrate hoch (> 93%) [7]. Vorteil dieser Therapie ist die niedrige Mortalitätsrate. Sie liegt nach 30 Tagen unter 13%. Dies trifft auch auf das erste Jahr des Follow-up (< 24%) zu [8]. Für die inoperable Patientengruppe kann die TAVI als mögliche Alternative betrachtet werden.

Bei TAVI wird eine biologische Herzklappenprothese genutzt (TAVR: Transcatheter Aortic Valve Replacement). Hierbei werden xenogene Materialien verwendet. Diese werden in einen Metallrahmen (= Stent) eingebracht. Vorteile von TAVR sind bspw. ein gutes hämodynamisches Verhalten. Auch niedrige thrombogene Komplikationsraten, die nach der Implantation auftreten können [9], lassen sich an dieser Stelle anführen. Mit diesen biologischen Materialien sind aber auch einige Nachteile verbunden. Die Fixierung beim

Herstellungsprozess erfolgt oftmals mit Glutaraldehyd. Damit verbunden sind eine Beeinträchtigung der Ultrastruktur des Gewebes und eine begrenzte Haltbarkeit [10]. Nach der Implantation kann es zu progressiven Verkalkungen kommen, was die Lebensdauer weiter verringert. Durch das Crimpen wird das TAVR zusammengedrückt, damit es implantiert werden kann. Ebenso ist die Degeneration von TAVR möglich [11] und der Patient muss sich einer beziehungsweise mehrerer re-TAVI unterziehen. Die langfristigen Auswirkungen in Bezug auf die Haltbarkeit von TAVR nach der Implantation können damit erhebliche Probleme bereiten. Dies gilt ebenso für das postoperative Management [12, 13]. Aus diesem Grund müssen die Herzklappenprothesen, die bereits verfügbar sind, weiterentwickelt werden.

Tissue Engineering (TE), das bei Herzklappenprothesen angewendet werden kann, trägt möglicherweise zur Behebung dieser Probleme bei. Bei den tissue-engineerten Herzklappen (TEHK) wird ein besonderes Grundgerüst verwendet. Es sind außerdem unterschiedliche Zelltypen für die Beschichtung des Gerüsts notwendig [14]. Im Gegensatz zu den Herzklappenprothesen, die herkömmlicherweise genutzt werden, gibt es bei den TEHK einige Vorteile. Dazu gehören die niedrige Thrombogenität und der Widerstand gegen Infektionen. Ferner wird die Fähigkeit zur Selbstheilung nach der Implantation erwähnt [15]. Viele Forschungsgruppen arbeiten derzeit an neuen Arten von Herzklappenprothesen. Hierbei wird u.a. auf dezellularisierte biologische Ausgangsstoffe oder Gerüste, die biologisch abbaubar und nicht abbaubar sind, zurückgegriffen. Für die Besiedlung dieser Gerüste dienen unterschiedliche Zellarten. Als Beispiele können Nabelschnur-, menschliche Gefäßzellen und Knochenmark-Stammzellen genannt werden [16]. Mithilfe von Bioreaktoren lassen sich die besiedelten Zellen allmählich an den physiologischen Shear-Stress anpassen. Dadurch liegt auf dem Gerüst eine stabile Zellschicht vor [17].

Diese Studie verfolgt das Ziel, eine neue dezellularisierte und gestentete biohybride Herzklappenprothese zu entwickeln. Die Zellbesiedelung erfolgte mit FB, danach mit EC. Die Integrität der Herzklappenprothesen wurde in verschiedenen Stadien untersucht: nach der Konditionierung, vor und nach dem Crimpen sowie nach Reperfusion. Des Weiteren bestand das Ziel darin, die

Herzklappenprothesen hinsichtlich ihrer mechanischen Funktionalität zu betrachten. Hierzu wurden die pulsatilen Flussbedingungen beobachtet.

Wichtige Hinweise

Die Ergebnisse der Experimente und der Versuchsaufbau basieren auf folgendem bereits veröffentlichten Artikel:

Koenig F, Lee JS. et al., Artificial Organs. Aug; 40(8):727-37. doi: 0.1111/aor.12683 (2016)

Diese Dissertation stellt diese Publikation ausführlich vor. Die Ergebnisse sind die gleichen. Diese Arbeit enthält somit Sätze, Abbildungen und Auszüge im Original aus dieser Publikation. Es finden sich Wort-für-Wort-Wiedergaben, eventuell werden eigene Begrifflichkeiten verwendet.

4. Medizinischer Hintergrund

4.1 Das Herz des Menschen

Das Herz eines Menschen besitzt eine konische Form und stellt ein fibromuskuläres Hohlorgan dar, das sich hinter dem Brustbein befindet. Zudem liegt es zwischen den beiden Lungenflügeln. Die untere Grenze reicht von der dritten bis zur fünften Rippe. Auf der Höhe der zweiten Rippe liegt die obere Grenze des Herzens. Zwei Drittel des Herzens befinden sich – von vorne gesehen – auf der linken Seite. Das Gewicht umfasst durchschnittlich 0,5% des Körpergewichts und es hat ca. die Größe einer menschlichen Faust. Die Herzwand setzt sich aus drei Schichten zusammen. Von innen nach außen betrachtet, sind das Endokard, Myokard und Perikard. Das Perikard wiederum besteht aus einem inneren und einem äußeren Blatt. Es umhüllt das Herz sackförmig. Zwischen den beiden Schichten befindet sich etwas Flüssigkeit (10 – 15ml), sodass sich das Herz ohne Probleme bewegen kann. Das Endokard ist für die innerste, glatte Oberfläche des Herzens verantwortlich. Die Herzklappen resultieren aus dessen Faltung. Das Endokard setzt sich meistens aus lockerem Bindegewebe, das aus Kollagen- und elastischen Fasern besteht, zusammen. Diese Schicht verhindert, dass sich Blutgerinnsel im Herzen bilden. Die dicke Muskelschicht (Myokard) liegt zwischen dem Peri- und Endokard. Es ist der kontraktile Teil des Herzens.

Ein gesundes Herz verfügt über vier Hohlräume (= Herzkammern). Diese setzen sich aus zwei Vorhöfen (Atrien) und zwei Kammern (Ventrikel) zusammen. Die Vorhöfe bestehen aus einer dünneren Muskelwand, deren Dicke etwa drei bis vier Millimeter beträgt. Die Muskeln besitzen außerdem zwei kleine Ausstülpungen, welche auch als Herzohren bezeichnet werden. Die dickwandigen Ventrikel liegen unter den Vorhöfen. Eine mittige Muskelschicht (Septum) sorgt für die Unterteilung in rechtes und linkes Herz, welche jeweils einen Vorhof und eine Kammer besitzen. Zwischen diesen befindet sich jeweils eine Segelklappe. Ferner gibt es eine Taschenklappe, die zwischen einem Ventrikel und dem anschließenden Gefäß liegt [18, 19].

Das Myokard besteht u.a. aus spezialisierten Muskelzellen, wie dem Sinusknoten. Dieser liegt an der oberen Hohlvene, die in den rechten Vorhof mündet. Er gehört zum Erregungsbildungssystem. Im Sinusknoten werden elektrische Impulse erzeugt. Sie werden entlang des nachfolgenden Erregungsbildungssystems übertragen, indem die rhythmische Kontraktion (Systole) und Relaxation (Diastole) des Myokards sequentiell wiederholt werden. Bei einem gesunden Herzen sind das circa 60 bis 80 Schläge min^{-1} .

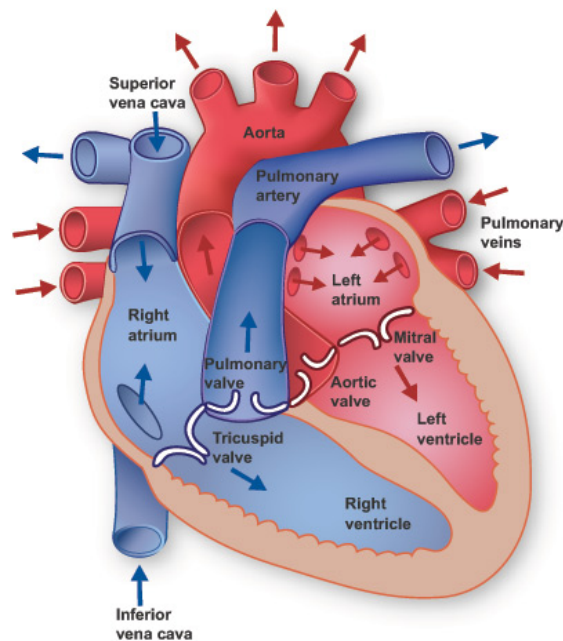


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des menschlichen Herzens mit abgehenden Gefäßen

Das Herz setzt sich aus rechtem (hellblau) und linkem Herz (hellrot) zusammen, die jeweils über einen Vorhof, Ventrikel und zwei Herzklappen verfügen. Die roten Pfeile stellen den Körperkreislauf und die blauen Pfeile den Lungenkreislauf dar. (Quelle: texasheart.org)

Die Aufrechterhaltung des Blutkreislaufes ist die physiologische Hauptaufgabe des Herzens. Er lässt sich in den großen (Körperkreislauf) und kleinen Kreislauf (Lungenkreislauf) unterteilen. Der Körperkreislauf enthält das sauerstoffreiche Blut. Dieses wird während der Systole vom linken Ventrikel über die arteriellen Gefäße in sämtliche Kapillaren des Körpers gepumpt. Ziel ist der Gasaustausch zwischen Gewebe und Blutgefäßen, wobei das Blut den Sauerstoff an das Gewebe abgibt. Im Gegenzug wird Kohlenstoffdioxid aufgenommen. Das sauerstoffarme Blut strömt dann in den rechten Vorhof zurück. Der darauf folgende Abschnitt wird als Lungenkreislauf bezeichnet. Das Blut fließt während

der Diastole in den rechten Ventrikel. Von dort gelangt es über die Lungenarterien in das Kapillarbett der Lunge. Im Anschluss findet der umgekehrte Gasaustausch statt, wobei das sauerstoffreiche Blut über die Lungenvene zum linken Vorhof transportiert wird [20, 21] (Abb. 4.1).

4.2 Herzklappen

4.2.1 Makroskopische Anatomie und Funktion

Ein gesundes menschliches Herz besteht aus vier Herzklappen. Sie können in Segelklappen (Atrioventrikularklappe: AV-Klappe) und Taschenklappen (Semilunarklappe) unterteilt werden. Die Herzklappen gehen auf Einfaltungen des Endokards zurück. Deren Aufhängung erfolgt an den faserigen Ringen des Herzskeletts und sie übernehmen eine Ventilfunktion. Bei jedem Herzschlag öffnen und schließen sich die vier Herzklappen. Auf diese Weise wird der unidirektionale Blutfluss an den richtigen Stellen sichergestellt.

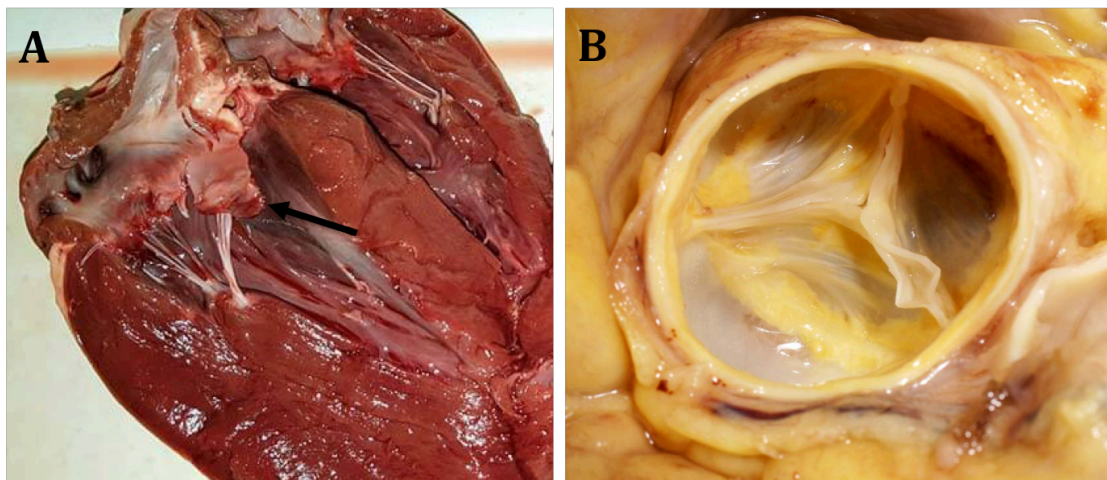


Abb. 4.2: Darstellung der beiden Herzklappentypen Segel der Mitralklappe (mit Pfeil), die durch Sehnenfäden mit den Papillarmuskeln im Ventrikel verbunden sind **(A)**. Aortenklappe, welche aus drei bauchigen Taschen besteht **(B)**. (Quelle A: anatomycorner.com, B: www.luks.ch)

Die Segelklappen bestehen aus Trikuspidal- und Bikuspidalklappe (Mitralklappe). Sie sind jeweils zwischen dem linken Vorhof und linken Ventrikel sowie rechten Vorhof und rechten Ventrikel angesiedelt. Die Namen sind auf die Segel der Segelklappe zurückzuführen. Die Segelklappen verfügen über zwei

(Bikuspidalklappe) und drei (Trikuspidalklappe) Segel, welche aus dem Endokard gebildet werden. Durch Sehnenfäden (Chordae tendineae) werden die Segel mit in der jeweiligen Kammer verankert. Dort hängen sie an den Papillarmuskeln. Die Sehnenfäden und Papillarmuskeln bilden einen subvalvulären Apparat. Sie haben keinen Einfluss auf das Öffnen und Schließen der Segelklappen. Sie können jedoch einen Prolaps des Segels in den Vorhöfen verhindern. Schließen sich die Segelklappen, lässt sich mithilfe eines Stethoskops der erste Herzton ausmachen.

Pulmonalklappe und Aortenklappe sind Taschenklappen. Sie setzen sich aus drei Taschen in Halbmondform zusammen und liegen zwischen Ausflusstrakt der Ventrikel und Haupt- (Aorta ascendens) bzw. Lungen-Schlagader (Arterie pulmonalis). Die Taschenklappen verfügen im Gegensatz zu den Segelklappen über keine Sehnenfäden. Besteht ein höherer Druck der Herzkammer gegenüber den beiden Schlagadern (Systole), öffnen sich die Taschenklappen. Dabei wird Blut von der Herzkammer in die Schlagader gepumpt. Die Taschenklappen sorgen während der Diastole dafür, dass kein Blut von der Aorta sowie Arteria pulmonalis in die Ventrikel zurückfließt. Schließen sich die Taschenklappen ist ein zweiter Herzton zu hören [22, 23].

4.2.2 Mikroskopische Anatomie und Funktion

Alle vier Herzklappen sind – mikroskopisch gesehen – ähnlich aufgebaut. So setzt sich die Aortenklappe beispielsweise aus drei verschiedenen Schichten zusammen. Dazu gehören als distale Schicht die „Ventrikularis“, die aus radial angeordneten elastischen Fasern besteht. Es folgen die „Spongiosa“ mit einer hohen Menge an Glykosaminoglykanen (GAGs) und als dritte Schicht die Fibrosa, welche Mehrheitlich aus Kollagenfasern besteht. Eine extrazelluläre Matrix (ECM) wird aus elastischen Fasern, Kollagen und GAGs gebildet. Die Quantität und Qualität der ECM hat Einfluss auf die Durabilität der Herzklappen. Ebenso beeinflussen sie die mechanische Funktionsfähigkeit einer Herzklappe [24]. Der Herzzyklus erzeugt mechanische Stimuli (Scher-Stress). Auf zellulärer Ebene findet dann eine Reizung und Interaktion zwischen ECM und Zellen statt. Damit einher geht eine intakte Klappenfunktion, Homöostase, Selbstreparatur usw.

Eine Herzklappe besteht aus zwei Zelltypen: interstitielle Zellen (IC) und Endothelzellen (EC). Zu den IC zählen glatte Muskelzellen (SMC), Fibroblasten (FB) und Myofibroblasten [25-28]. EC bilden die Oberfläche einer Herzklappe und wirken damit antithrombogen. Sie spielen außerdem bei inflammatorischen Reaktionen und Immunreaktionen eine entscheidende Rolle. Die IC hingegen sind für den Aufbau und Erhalt der ICM essentiell [10, 15].

4.2.3 Herzklappenerkrankungen

Bei Herzklappenerkrankungen (Klappenvitien) ist die Funktion einer oder mehrerer Herzklappen gestört, wobei die Ätiologien, beispielsweise das Marfan-Syndrom, das selten angeboren ist. Die Klappenvitien lassen sich in zwei großen Gruppen einteilen: Die Stenosen und die Insuffizienzen.

Stenosen

Die Stenose beschreibt eine inadäquat öffnende Herzklappe (Abb. 3.4). Als Ursache kommen oftmals progressive Verkalkungen (Sklerosen) in Frage. Diese sind meist durch das Alter bedingt, können aber auch auf Entzündung der Herzklappen zurückgeführt werden. Gründe hierfür sind Herzinnenhautentzündungen oder rheumatisches Fieber. Weitere mögliche Ursachen stellen pathologische Herzmuskeländerungen bei Herzinfarkten oder Infektionen dar. Die Herzklappen funktionieren ebenfalls nur eingeschränkt. Ebenso trifft das auf einen angeborenen Herzklappenfehler (bikuspide Aorten- und Pulmonalklappe) zu [29-31]. Als Risikofaktoren der erworbenen Herzklappenstenosen können beispielsweise Diabetes mellitus, Nikotinabusus, arterieller Bluthochdruck und familiäre Disposition sowie Hypercholesterinämie genannt werden.

Die oben aufgezählten Ursachen führen dazu, dass die Segel verschmelzen, verdicken oder versteifen. Die Folge ist eine verringerte Klappenöffnungsfläche, die bei Erwachsenen normalerweise drei bis vier Quadratzentimeter umfasst [32, 33]. Bei einer Aortenstenose (AS) versucht das Herz als Kompensationsmechanismus, einen höheren Druck in der linken Herzkammer herzustellen. Dies ist nötig, damit die gleiche Menge des Bluts durch die

verengten Segel gepumpt werden kann. Hieraus resultiert eine deutlich höhere mechanische Belastung. Diese führt zu einer konzentrischen linksventrikulären Hypertrophie des Herzens. In der Folge kann es zur Herzinsuffizienz kommen [11, 34]. Wird diese nicht behandelt, könnte Dyspnoe oder ein Beklemmungsgefühl (Angina pectoris) im Brustbereich auftreten. Auch Schwindel sowie Synkopen sind möglich. Bei stenosierten Herzklappen im rechten Herz ergeben sich Anzeichen einer Rechtsherzinsuffizienz wie Leistungsminderung, Hepatomegalie und Aszites.

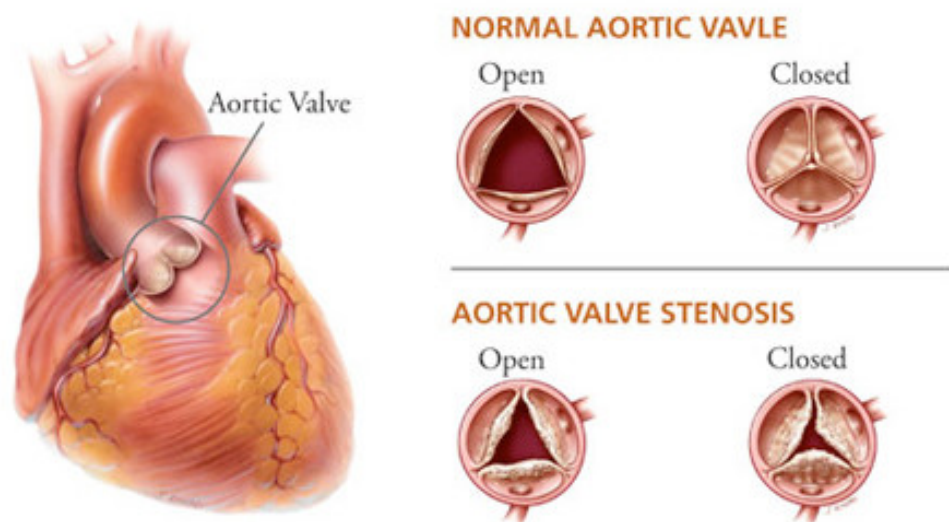


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Aortenstenose. Die kalzifizierte Aortenklappe öffnet und schließt während Systole sowie Diastole im Vergleich zu der normalen Aortenklappe unvollständig. (Quelle: Intermountain health care.org)

Insuffizienzen

Bei der Herzklappeninsuffizienz (-regurgitation) kann sich die betroffene Herzklappe nicht richtig schließen. Blut fließt in die Struktur zurück, die vor der insuffizienten Herzklappe liegt. Dieser Prozess findet bei einer Taschenklappeninsuffizienz während der Diastole statt. Die Rückströmung führt dazu, dass sich das enddiastolische Volumen des jeweiligen Ventrikels erhöht. Die Folge ist eine Belastungsanpassung (Frank-Starling-Mechanismus) durch die passive Vordehnung des Herzmuskels. Dies ist beispielsweise im linken

Ventrikel bei einer Aorteninsuffizienz möglich. Im weiteren Verlauf kann es wie bei der Stenose zu einer Dilatierung und Hypertrophierung des Herzens kommen. In der Folge besteht die Gefahr einer verminderten Belastbarkeit oder Ruhe- ggf. Belastungsdyspnoe. Ebenfalls kann es zur Ermüdung kommen. Bei Pulmonal- oder Mitralinsuffizienz sind oben beschriebene Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz zu finden. Als häufigste Ursache kommen rheumatische Beschwerden in Frage. Aber auch Autoimmunerkrankungen wie der systematische Lupus erythematodes oder die infektiöse Endokarditis sind als Gründe zu nennen [35, 36].

Die Diagnose einer Herzklappenerkrankung erfolgt initial meist anhand der körperlichen Symptomatik. Als Beispiele können die pathologische Pulsqualität und Herzgeräusche angeführt werden. Aber auch nicht-invasive Methoden können zur Erkennung eingesetzt werden. Die thorakale Echokardiographie hilft dabei, die Klappenbewegungen zu untersuchen. Es werden zusätzlich Klappenöffnungsfläche sowie Myokardwände ausgemessen. Bei der Doppler-Echokardiographie werden die Flussgeschwindigkeit und die transvalvulären Druckgradienten ermittelt. Röntgenthorax und Elektrokardiographie können ebenfalls zur unterstützenden Beurteilung herangezogen werden. Herzkatheteruntersuchung, transösophageale Echokardiographie und kardiale Computertomographie können für einen optimalen Therapieplan eingesetzt werden [37, 38]. Die Einteilung von Aortenstenose geht allerdings meist auf die Befunde zurück, die echokardiographisch erhoben werden (Tab. 4.1).

Grad	Jet Geschwindigkeit, (m/s)	Mittlerer Druckgradient, (mmHg)	Klappenöffnungsfläche, (cm ²)
leicht	< 3.0	< 25	1.5
mittelgradig	3 - 4	25 - 40	1.0 - 1.5
hochgradig	> 4	> 40	< 1.0

Tabelle 4.1: Gradeinteilung der Aortenstenose. Wenn alle oben erwähnten Kriterien zutreffen, kann von einer hochgradigen Aortenstenose gesprochen werden.

4.2.4 Therapie der Herzklappenerkrankungen

Um eine Autoimmunerkrankung, Endokarditis oder kardiovaskuläre Risikofaktoren zu behandeln, sind Medikamente nötig. Patienten, die eine

hochgradig symptomatische Herzklappenerkrankung aufweisen, sind ebenfalls therapiebedürftig. Bei einer hochgradigen AS mit Symptomatik und notwendigem Aortenklappenersatz (AKE) [2], gibt es mittlerweile zwei mögliche Behandlungsformen. Dazu gehören das operative, sowie ein weniger invasives Verfahren, die sogenannte TAVI (Transcatheter Aortic Valve Implantation). Die operative Methode wurde in den vergangenen Jahren standardmäßig durchgeführt. Für alte und multimorbide Patienten war dieses Verfahren jedoch ungeeignet. Verschiedene interventionelle Therapien wurden entwickelt, um den Patienten eine weitere effektive Therapie anzubieten. So führten Dr. Anderson und seine Kollegen im Jahr 1992 eine kathetergestützte biologische Aortenklappenprothese Implantation bei Schweinen durch. Sie wurde mittels Ballon dilatiert und transluminal implantiert [39]. Die TAVI konnte im Jahr 2002 in Frankreich erstmals erfolgreich bei einem Menschen umgesetzt werden. In diesem Fall wurde eine kathetergeführte Prothese mithilfe eines transvenösen Zugangs eingesetzt. Die Implantation erfolgte transseptal [6]. Im Laufe der Zeit haben sich neue Prothesentypen und TAVI-Prozeduren, bei denen unterschiedliche Zugänge genutzt werden, entwickelt [40, 41]. Im Jahr 2007 erhielt die TAVI für ein AKE-Verfahren in Europa eine Zulassung. Mittlerweile stellt die TAVI eine standardmäßige Therapie dar, insbesondere für ältere und multimorbide Patienten, die an einer hochgradig symptomatischen AS leiden [42-45].

Beim TAVI-Prozedere erfolgen je nach Verfahren entweder eine lokale Betäubung oder eine Allgemeinanästhesie. Ein Katheter mit dem bereits komprimierten biologischen AKE wird über einen Führungsdraht in den Zielbereich gebracht. Als Kontrolle fungieren die transösophageale Echokardiographie und eine radiologische Bildgebung. Diese wird genutzt, um den AKE zu implantieren (Edwards-Sapien). Dies erfolgt in Abhängigkeit des Prothesentyps entweder mittels Ballondilatation oder Selbstexpansion (Medtronic CoreValve). Dieses Verfahren ist nicht frei von Risiken. Daher muss bei der Durchführung ein Herzchirurg anwesend sein. Nach der TAVI ist zuerst eine duale Antikoagulation mit Acetylsalicylsäure und einem Inhibitor des Adenosindiphosphat (ADP-)-Rezeptors, beispielsweise Clopidogrel, für drei

Monate, danach eine lebenslange Antikoagulation mit Acetylsalicylsäure erforderlich [46, 47].

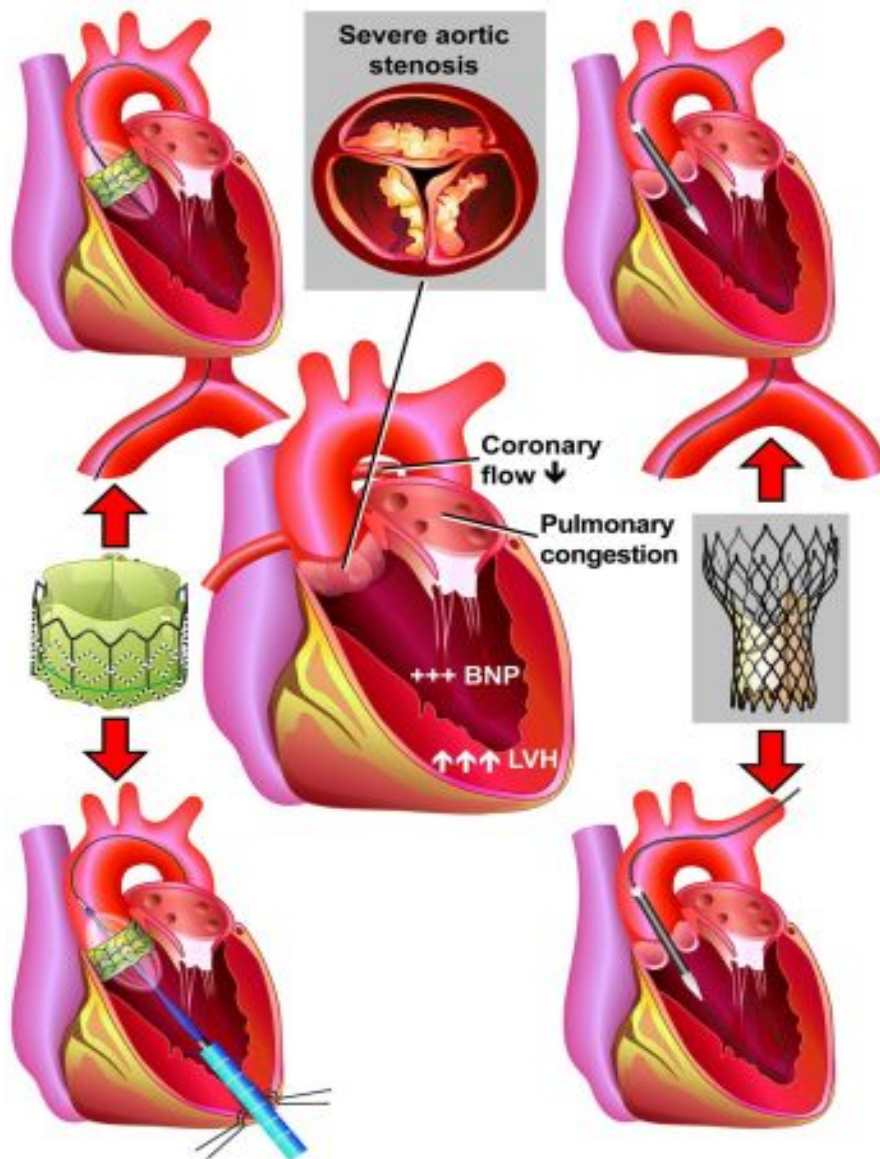


Abb. 4.4: Schematische Darstellung des TAVI Verfahrens Es gibt zwei Zugänge: transapikal (links unten), transfemoral (rechts). (Quelle: cardiachealth.org)

Im Gegensatz zum offen-chirurgischen AKE lässt sich bei TAVI vor der Implantation keine komplette Entfernung der pathologischen Herzklappe vornehmen. Daher erfordert die TAVR einen kleineren Durchmesser. Eine noch kleinere AKE ist bei Re-TAVI-Kandidaten („valve-in-valve“) erforderlich, beispielsweise wenn die implantierte AKE degeneriert. Eine paravalvuläre Leckage der TAVR ist eine andere Komplikation. Je nach Lokalisation der TAVR

sind Koronarobstruktionen oder Erregungsleitungsstörungen möglich [48]. In Kapitel 2.2.4 werden der Typ und die Struktur der TAVR näher erörtert.

4.2.5 Herzklappenprothesen

Mechanische Herzklappenprothesen (= MHKP)

Alle MHKP sind ähnlich aufgebaut und setzen sich aus drei Teilen zusammen, die unentbehrlich sind: Gerüst, Ventilkörper und Nahtring. Der Ventilkörper besteht aus einem rigiden und einem beweglichen Teil. Das kann z.B. eine Kugel sein. In Frage kommen aber auch eine Kippscheibe bzw. zwei Flügel, die eine Halbmondform besitzen. Das Gerüst besteht oft aus einem Graphit mit pyrolytischem Kohlenstoff. Die Bewegung des Ventilkörpers ist passiv im Blutstrom. Gleichzeitig fungiert der Ventilkörper während der Diastole als Dichtung. Der Nahtring ist mit dem Gerüst verbunden. Dadurch lässt sich die MHKP implantieren.

Entsprechend ihrer Flusscharakteristik lassen sich MHKP in zwei Arten unterteilen. So besitzt die Starr-Edwards-Prothese ein Stahl- oder Silikon-Kugelventil. Hier liegt eine seitliche Strömung vor. Bei einem anderen Modell wie einem Ventilkörper, der sich durch zwei halbmondförmige Flügel auszeichnet, kann eher eine zentrale Strömung vorliegen. Alle MHKP weisen prinzipiell die gleiche Funktionsweise auf. Bei Systole und Diastole ergeben sich verschiedene Druckgradienten. Dies beeinflusst das Öffnen und Schließen der Ventilkörper.

Die „Starr-Edwards-Prothese“, eine Kugelprothese, wurde im Jahr 1960 vorgestellt. Im gleichen Jahr erfolgte die erste Implantation der Kugelprothese beim Menschen. Seitdem wurden die verschiedenen Modelle von MHKP weiterentwickelt. Die Kippscheibenprothese wurde im Jahr 1968 und die Zweiflügelprothese im Jahr 1977 erstmalig vorgestellt [49-53].

Wurde ein MHKP mit Erfolg implantiert, ist ein Klappengeräusch zu hören. Die Rede ist vom sogenannten „Prothesenklick“. Dieser wird erzeugt, da beim Schließen der MHKP der oder die Ventilkörper auf den Klappenring aufprallen.

Der große Vorteil dieses Prothesentyps ist die Haltbarkeit. Durch die körperfremden Materialien können jedoch Blutgerinnsel entstehen, was als Nachteil anzusehen ist, weshalb Prothesenempfänger ihr Leben lang zu antikoagulieren sind. In Frage kommt beispielsweise Phenprocoumon

(Handelsname: Marcumar®), ein Vitamin-K-Antagonist. Ein erhöhtes Blutungsrisiko als unerwünschte Nebenwirkung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, weshalb sich vor allem ältere Prothesenempfänger einer wöchentlichen INR-Kontrolle unterziehen müssen. Ebenso kann sich die Einnahme täglich bzw. wöchentlich ändern. Neue orale Antikoagulantien, sind heutzutage eine Alternative. Hierzu liegen jedoch noch keine Langzeitstudien vor.

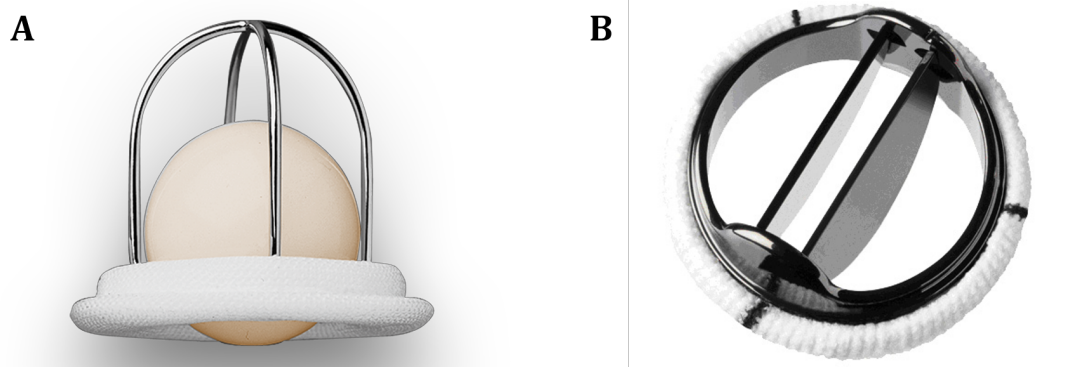


Abb. 4.5: Mechanische Herzklappenprothese Kugelprothese (A), Zweiflügelprothese (B)
(Quelle: Edwards Lifesciences)

Biologische Herzklappenprothesen (= BHKP)

Die ersten MHKP-Implantationen erfolgten in den 1960er-Jahren. Die Gefahr einer Thromboembolisation stellte jedoch eine große Herausforderung dar. Aus diesem Grund wurden klinische Studien und Forschungen überall auf der Welt in Auftrag gegeben.

Donald Ross war ein Thoraxchirurg aus Großbritannien, der 1962 erstmalig eine Aortenklappe mit einem Homograft ersetzte. Diese wurde subkoronar eingesetzt [54]. Jean-Paul Binet und Kollegen konnten im Jahr 1965 erste Erfahrungen mit mercurochrom- und formalin-vorbehandelten Xenografts sammeln. Hier standen ihnen fünf Patienten zur Verfügung, die alle ohne Antikoagulation überlebten. Schließlich griff Ross 1967 auf eine neue Technik zurück und implantierte eine autologe Herzklappe. Die stenosierte Aortenklappe wird entfernt und durch die

körpereigene Pulmonalklappe (Autografts) ersetzt. Anstelle der Pulmonalklappe kann eine fremde menschliche Pulmonalklappe (Homografts) implantiert werden [55].

Dass eine Gewebestabilität zur Vorbeugung immunologischer Reaktionen und der Kollagendenaturierung vorliegen muss, erkannte Carpentier Ende der 1960er-Jahre. Bei seinem Versuch wurde eine Schweineaortenklappe mit Hanks-Lösung und mit Glutaraldehyd gewaschen. In diesem Zusammenhang wurde das Design der Xenografts verbessert. Das Schweineperikard, das mit Glutaraldehyd fixiert ist, wird in einen Kunststoffring eingenäht. Dieser ist von einer Polyestermanschette umgeben. Diese Aorten- sowie Mitralklappenprothesen kommen inzwischen überall auf der Welt zum Einsatz [56].

Eine dauerhafte Marcumarisierung ist bei BHKP-Empfängern nicht nötig. Darauf wurde bereits oben eingegangen. Nachteilig ist dennoch, dass durch die Fixierung mit Glutaraldehyd BHKP rasch degenerieren und kalzifizieren [10]. Die durchschnittliche Lebensdauer einer BHKP beträgt heutzutage 15 Jahre [57].

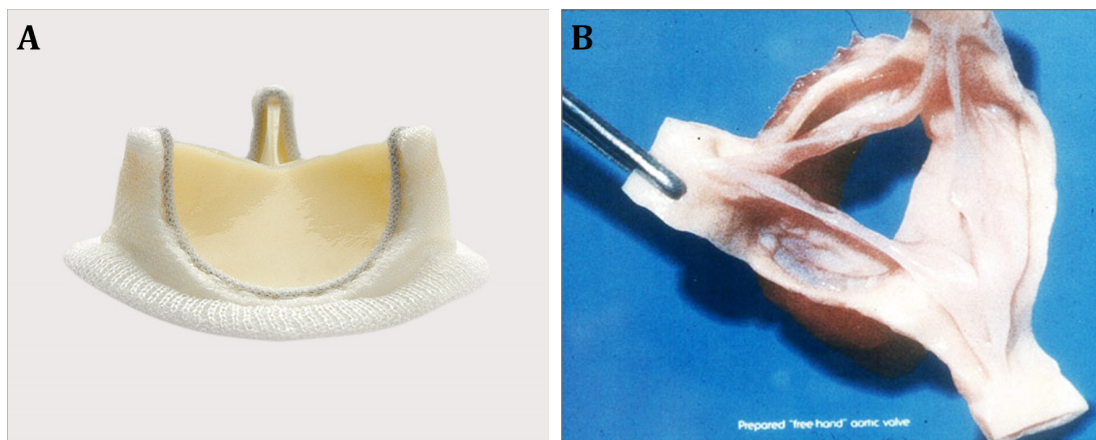


Abb. 4.6: Biologische Herzklappenprothese Rinderperikardherzklappe (A) Homograft (B)
(Quelle: A: Edwards Lifesciences, B: <http://www.drgokhale.com>)

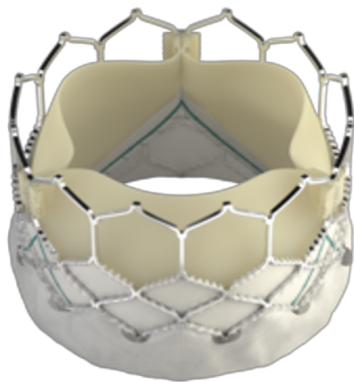
Transkatheter-Aortenklappen-Prothese/Replacement (= TAVR)

Die TAVR, die oben genannt werden, zählen zu den BHKP. Die Segel der TAVR bestehen aus Rinderperikard. Während der Herstellung kommt, genau wie bei anderen BHKP, ein Fixierungsschritt zum Einsatz. Im Vergleich zum chirurgischen BHKP verfügen die TAVR über einen passiven Cobalt-Chrom-Stent wie die Edward-Sapien-Klappen oder einen selbst-expandierbaren Nitinol-Stent.

Die Edward-Sapien-Klappen können über einen transapikalen sowie transfemorale Zugang implantiert werden. Es gibt auf dem Markt unterschiedliche Klappengrößen: 20, 23, 26 und 29mm.

Bei selbst-expandierenden TAVR besteht das Gerüst dagegen aus Nitinol. Ein solches Beispiel ist die CoreValve (Medtronic Inc.), welche ein Gerüst aus der Formgedächtnislegierung besitzt. Es ist möglich, den Nitinol-Stent durch Temperatur anzuregen. CoreValve, die in bestimmten Größen hergestellt werden, werden in eine katheterfähige Form komprimiert, bevor sie implantiert werden. Während der Implantation findet die Transformation zu memorierten Größen unter Körpertemperatur statt. Sie verfügen über eine ähnliche Lebensdauer wie BHKP [46, 58, 59].

A



B



Abb. 4.7: TAVR Edward-Sapien-Valve (A) Medtronic Core Valve (B)

(Quelle: A: Edwards Lifesciences, B: Medtronic)

4.3 Tissue Engineering

4.3.1 Hintergrund

Die Zahl der chirurgischen Operationen im Jahr 2012 lag weltweit bei etwa 359,5 Millionen. Im Vergleich zu 2008 mit 266,2 Millionen sind die chirurgischen Eingriffe über die Zeit jährlich angestiegen [62]. Jede Operation ist mit vielen Risiken verbunden. Dauerhafte postoperative Behandlungen lassen sich nach Ersatzeingriffen oder (mehreren) Organresektionen nicht vermeiden wie ein

regelmäßiger Beutelwechsel bzw. die Entleerung des Beutels bei Urostoma. Ferner kann eine dauerhafte Antikoagulation nach MHK-Ersatz erforderlich sein. Die Kosten pro Eingriff sind erheblich. Ebenso die Ausgaben für den prä- und poststationären Aufenthalt. Hierunter fallen auch Organtransplantationen. Die Anzahl der Menschen auf den Wartelisten ist laut Organspende-Statistik sehr hoch. Im Gegensatz dazu fällt die Organspende in der Welt deutlich niedriger aus, weshalb lange Wartezeiten entstehen. In dieser Zeit können sich die Organfunktionen weiter verschlechtern, gegebenenfalls ist der Wartende kurz davor, zu sterben. Um eine Abstoßungsreaktion zu vermeiden, werden Organempfänger lebenslang Immunsuppressiva verschrieben, was dazu führt, dass eigene Abwehrmechanismen unterdrückt werden. Hierdurch erhöhen sich wiederum das Infektionsrisiko und die Kosten.

Durch Verwendung des „Tissue Engineering“ (TE) lässt sich eine Lösung für die Probleme anbieten. Laut Langer und Vacanti ist das Fach „Tissue Engineering“ ein interdisziplinäres Forschungsfeld. Hier werden medizinische, biologische, chemische und mechanische Kenntnisse der regenerativen Medizin miteinander verbunden, um die erkrankten Strukturen oder Organe wiederherzustellen bzw. zu ersetzen. Sie sollen voll funktionsfähig sein und idealerweise eine Regenerationsfähigkeit besitzen. Hierzu sind in-vitro erzeugte und eigene Stimulationsprozesse notwendig, wobei autologe, bzw. allogene Zellen und ein Zellträgersystem miteinander kombiniert werden. Ziel ist die anatomische und physiologische Nachbildung eines gesunden Organs. Am Zellträger siedeln sich Zellen an. Sie unterstützen nach der Implantation die Integration und Interaktion mit bestehenden Zellen, was weniger Komplikationen verursachen soll. Zudem wird von einem Wachstumspotential, einer verlängerten Haltbarkeit und Infektionsresistenz ausgegangen [15, 63-67].

4.3.2 Zellquelle

Heutzutage können für TE viele unterschiedliche Zellquellen genutzt werden. Abhängig vom Anwendungsgebiet bzw. dem Gewebe/Organ ist es möglich, auf bestimmte Zelltypen zurückzugreifen. So können postembryonale und

embryonale Stammzellen gemeinsam mit ausdifferenzierten Zellen für die allogene bzw. autogene Behandlung verwendet werden.

Gesunde embryonale Stammzellen (ESC) sind dazu in der Lage, sich in spezialisierte differenzierte Zelltypen zu verwandeln. Obwohl sie immer noch eine Proliferationsfähigkeit haben, sind sie pluripotent. Aufgrund des Differenzierungspotentials wird hier Potenzial für TE gesehen. Als problematisch gestaltet sich die Gewinnung und weitere Verwendung von ESC. Hierbei sind insbesondere ethische Aspekte zu nennen. Beim Gewinnungsprozess müssen frühe menschliche Embryonen zerstört werden. Ferner gestaltet sich die zielgerichtete Gewinnung von ESC aufwendig. Aus diesen Gründen fokussieren sich viele Wissenschaftler auf die postembryonalen Stammzellen (PESC) [65, 68-71].

Hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen (Vorläuferzellen der Bindegewebe) werden den PESC zugeordnet. Diese Zellen liegen in vielen Organen vor. Als Beispiele können das Knochenmark, Gehirn, Haut, Leber, Plazenta und Pankreas sowie Nabelschnur genannt werden. Es gibt nur eine begrenzte Anzahl an PESC, die mit zunehmendem Alter weniger wird. PESC lassen sich im Gegensatz zu ESC in vitro langsam kultivieren. Ihr Differenzierungspotential ist eingeschränkt, da sie ausschließlich die ursprünglich „programmierten“ Zellarten ausbilden [72-74].

Ausdifferenzierte Zellen lassen sich einfach isolieren und kultivieren wie beispielsweise Fibroblasten und Endothelzellen menschlicher Gefäße (Vena saphena magna) [75, 76]. Auf biologischen Zellträgern ist die Besiedlung sehr gut, ebenso die Formierung sowie Proliferation des Gewebes [77]. Die Proliferation steht nicht in Zusammenhang mit dem Alter der Zellspender [16].

4.3.3 Zellträger (Scaffold)

Im Rahmen des 3D-Bioprintings versuchen sich unterschiedliche Arbeitsgruppen an der Herstellung eines neuen Zellträgersystems. Dennoch können isolierte Zellen bis heute nicht selbstständig ein neues Gewebe bilden, weshalb die Zellen auf einem Zellträger, der entweder aus natürlichem oder synthetischem Material besteht, besiedelt werden [78] [79].

Auch der Zellträger muss sich implantieren lassen, woraus eine gewisse Vielfältigkeit notwendig wird. Abhängig vom Implantationsort sollte der Zellträger dementsprechend hergestellt werden. Er muss präzise funktionieren. Zudem muss er die unter physiologischen Bedingungen erforderlichen mechanischen Eigenschaften aufweisen. Der Zellträger sollte beim Einsetzen seine Form nicht ändern und er muss eine geeignete Oberflächenstruktur und Architektur aufweisen. Das ist davon abhängig, mit welchem Zelltyp er verbunden wird. Nur so ist eine optimale Zellbeschichtung möglich. Hieraus ergibt sich zudem eine weitere Proliferation sowie Differenzierung [80, 81]. Ferner muss seine Biokompatibilität gegeben sein. Nach der Implantation darf es zu keiner Fremdkörperreaktion kommen. Es gibt jeweils zwei Klassen von Zellträgermaterial mit entsprechenden Vor- und Nachteilen [82-84].

Synthetische Zellträger

PGA (polyglycolic acid), PCL (polycaprolactone), PLA (polylactic acid) und PLGA (kombinierter Werkstoff mit PGA und PLA) haben durch die FDA bereits eine Zulassung erhalten. Verschiedene Arbeitsgruppen haben sie bereits erforscht [85-87]. Es hat sich in diesem Zusammenhang ergeben, dass diese Materialien leicht kontrollierbar und produzierbar sind. Dies trifft insbesondere auf ihre Eigenschaften wie Porengröße und Degradation zu. Als nachteilig angesehen werden die Thermoplastizität und die mechanischen Eigenschaften [88]. Auf die Biokompatibilität, hervorragenden mechanischen Eigenschaften, Flexibilität sowie gute Herstellbarkeit mit Polyurethan-(PU) Scaffolds verweisen Janik et al. und andere Arbeitsgruppen [89, 90].

Natürliche Zellträger

Als natürliche Zellträger gelten Biopolymere, also Kollagen, Fibrin Glykosaminoglykane und Chitosan. Ebenso fallen Homo-(= Allo-)/Xenografts darunter. Es ist jedoch nötig, sie vor der Beschichtung der Zellen chemisch zu modifizieren, indem Zellbestandteile unter Zuhilfenahme von Detergenzien beseitigt werden. Hierdurch kann eine immunologische Abstoßungsreaktion verringert oder ganz verhindert werden. In diesem Fall ist auch von der Dezellularisierung die Rede [91]. Kryokonservierte und dezellularisierte

Homografts besitzen die gleiche Morphologie. Damit verbunden ist eine gute Biokompatibilität, mechanische Eigenschaften sowie Besiedelbarkeit [92-94].

4.3.4 Bioreaktor

Meist ist es nötig, die auf einem Zellträger besiedelten Zellen, bevor sie implantiert werden, zu konditionieren. Hierdurch wird eine weitere Proliferation und Transformation angestoßen. Ebenso entstehen dadurch verbesserte mechanische Eigenschaften. Diese Konditionierung ist mithilfe eines sogenannten „Bioreaktors“ möglich. Hier gibt es keine allgemein anerkannte Definition. Barron et al. verstehen darunter „a system that simulates physiological environments for the creation, physical conditioning, and testing of cells, tissues, precursors, support structures, and organs in vitro“ [95]. Der Bioreaktor ist also ein System, welches die physiologischen Bedingungen simuliert um die Erzeugung, die physische Konditionierung und die Prüfung von Zellen, Gewebe, Vorläufer, Stützstrukturen und Organen in vitro zu ermöglichen. Der Bioreaktor muss einige Voraussetzungen mitbringen, damit physiologische Bedingungen effektiv simuliert werden können. Ebenso muss er über Unterstützungssysteme verfügen. Das Material des Bioreaktors, bevor es verwendet wird, ist zu sterilisieren. Zudem muss eine Kompatibilität zu den beschichteten Zelltypen vorliegen [96]. Bioreaktoren werden meist im Brutschrank gelagert. Es muss ein konstanter pH-Wert, pCO_2 von 5% und eine Temperatur von $37^\circ C$ vorliegen. Im geschlossenen System müssen an den Bioreaktor Luftfilter angeschlossen werden. Für das Wachstum der Zellen ist ein Nährmedium nötig.

Eine Zellkulturflasche dient der statischen Kultivierung. Es ist die einfachste Art eines Bioreaktors. Der Deckel einer Zellkulturflasche verfügt über einen Luftfilter. Es ist möglich, Zellen unter sterilen und physiologischen Bedingungen zu kultivieren. Bei dreidimensionalen Zellträgern sind bei der statischen Kultivierung die Zellverteilungen und -besiedelungen limitiert und ungleichmäßig. Dies trifft für alle Oberflächen zu. Die Schwerkraft führt bei dreidimensionalen Zellträgern dazu, dass sich Zellen ausschließlich in Richtung der nach oben ausgerichteten Flächen ablagern und proliferieren. Um hingegen

eine homogene Verteilung der Zellen zu erreichen ist der Einsatz von Rotations- bzw. Bewegungsbioreaktoren notwendig. Hierzu werden zum Beispiel „spinner flask“ und „rotating wall vessel reactor“ gezählt. Im Fall der Spinnerflasche befindet sich ein dreidimensionales Gerüst am Deckel der Flasche. Zudem werden die Zellen mithilfe eines Magnetrührers in das Nährmedium, welches dann als Zellsuspension vorliegt, gemischt. Eine 3D-Rotations- und Taumelbewegung sorgt für eine gleichmäßige Zellverteilung und Zellbesiedelung auf allen Flächenabschnitten des Zellträgers. Dabei werden entsprechende Dreh- und Ruhezeiten berücksichtigt [97-100].

Besonders auf dem Gebiet des Kardialen Tissue Engineerings (CTE) sollten tissue-engineerte Zellträger eine ausreichende mechanische Integrität aufweisen. Sie müssen eine Transformation sowie weitere Proliferation unter arteriellem Blutdruck aushalten. Pulsatile Bioreaktoren, die aus mehreren Antriebseinheiten bestehen können, hierbei behilflich sein. Hierdurch können tissue engineerte Konstrukte einer mechanischen Stressreaktion ausgesetzt werden. Dies wären zum Beispiel die Scher- und Druckkraft. Es ist normalerweise möglich, die Flussrate mithilfe einer Steuereinheit zu kontrollieren. Eine solche Konditionierung ist dynamisch und verfügt im Gegensatz zur etablierten statischen und dreidimensionalen Zellkultur über eine deutlich bessere mechanische Stabilität, Funktionalität sowie Zellularität [101-103].

5. Material und Methoden

In diesem Kapitel wird auf die biohybriden Klappenprothesen, deren Herstellung sowie die anschließende in-vitro Testung eingegangen. Zudem werden die Untersuchungsmethoden dieser Prothesen genauer betrachtet. Kapitel 5.1 setzt sich mit der Extraktion und Kultivierung, aber ebenso mit der Lagerung der Endothelzellen (EC) und Fibroblasten (FB), die für die Beschichtung benötigt werden, auseinander. In Kapitel 5.2 wird auf den eigentlichen Herstellungsprozess der Prothesen eingegangen. Das Kapitel 5.3 untersucht den Einsatz von biohybriden Klappenprothesen unter physiologischen Bedingungen. Im Verlauf der Studie wurde eine kathetergestützte Aortenklappenimplantation simuliert.

5.1 Zellkultur

Die Zellkulturen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind eigens dafür isoliert worden. Dies fand unter einer Sterilbank statt. Die Lösungen und Medien, um die Zellen zu züchten, müssen keimfrei sein. Sie wurden daher vor ihrer Nutzung auf 37°C erwärmt. Die Voraussetzungen für die Zellkultivierung im Brutschrank waren: 37°C Umgebungstemperatur, 5% CO₂-Anteil und 95% Luftfeuchtigkeit.

5.1.1 Zell-Isolation und Zellkultur

Sowohl die FB als auch EC wurden aus Vena Saphena Magna-Segmenten isoliert. Die Venenrestsegmente wurden von der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Großhadern München sowie der Herzklinik Augustinum München zur Verfügung gestellt. Sie fielen im Rahmen von Bypassoperationen als Abfall an und konnten zu Forschungszwecken weiterverwendet werden. Bevor der Eingriff erfolgte, mussten die Spender zustimmen, dass ihre Venen für Forschungszwecke verwendet werden durften. Die Verwendung erfolgt anonym.

Eine entsprechende Bescheinigung der Ethikkommission der LMU München lag vor. Die Aufbewahrung der gewonnenen Venen erfolgte in 25ml Abholmedium, dem Medium 199¹ (M199) und 0.2% Penicillin-Streptomycin² (Pen/Strep). In dieser wurden sie vor der Zellisolation nicht länger als zwei Tage bei 4°C gelagert.

In einem ersten Schritt erfolgte die EC-Isolierung. Dafür ist ein 5 bis 7cm langes Venensegment verwendet worden, wobei der obere Teil der Vene mit einem Dreiwegehahn³ (Abb. 5.1A) kanüliert wurde⁴. Der Venenteil, der mit der Kanüle überlappte, wurde mittels eines chirurgischen Knotens⁵ fixiert und festgeklemmt. Um Erythrozyten und Plaques in dem Venenlumen zu entfernen, sind anschließend 15ml Spüllösung⁶ eingesetzt worden. Sie wurde über eine an dem Dreiwegehahn angeschlossene 20ml Spritze⁷ pulsierend dazugegeben. Anschließend fand die Befüllung der Gefäßstücke mit 10ml einer steril filtrierten Kollagenase-Lösung⁸ und 15 minütiger Inkubation im Brutschrank (Abb. 5.1B) statt, damit sich die Endothelzellschicht von der Vene lösen konnte. Auf diese Weise konnten EC isoliert und mit 15ml Stopplösung⁹ in einem 50ml Röhrchen¹⁰ aufgefangen und bei Raumtemperatur (RT) fünf Minuten lang zentrifugiert werden. Im Anschluss konnte der Überstand abgesaugt werden. Bei diesem Vorgehen durfte das Zellpellet nicht berührt werden. Die Resuspendierung wurde mit 4.5ml Endothelzellen-Wachstumsmedium¹¹ (EGM) vorgenommen. Dieses setzte sich aus 5% Fetal calf serum (FCS) und 0.2% Pen/Strep zusammen.

¹ M199: Biochrom AG, Berlin, Germany

² Pen/Strep: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

³ B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany

⁴ Medtronic GmbH, Meerbusch, Germany

⁵ Resorba, Nuernberg, Germany

⁶ (494ml M199 + Heparin 5000I.E: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany + 10mg/ml Gentamicin: Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany)

⁷ Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany

⁸ 14mg Kollagenase-Pulver: Worthington Biochemical Corporation/Cell Systems GmbH, St. Katharinen, Germany + 10ml Human Serum Albumin: HSA, ZLB Behring, Bern, Switzerland

⁹ 500ml M199 + 20% fötalem Kälberserum: FCS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland

¹⁰ Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

¹¹ EGM: Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland

EC und EGM wurden gemeinsam in eine T12.5cm² Zellkulturflasche¹² gegeben (Abb. 5.1C). Anschließend sind diese im Brutschrank gelagert worden. Eine Kontrolle wurde nach etwa zwei Tagen unter dem Lichtmikroskop vorgenommen.¹³ Ein Wechsel des ECM erfolgte regelmäßig alle zwei bis drei Tage.

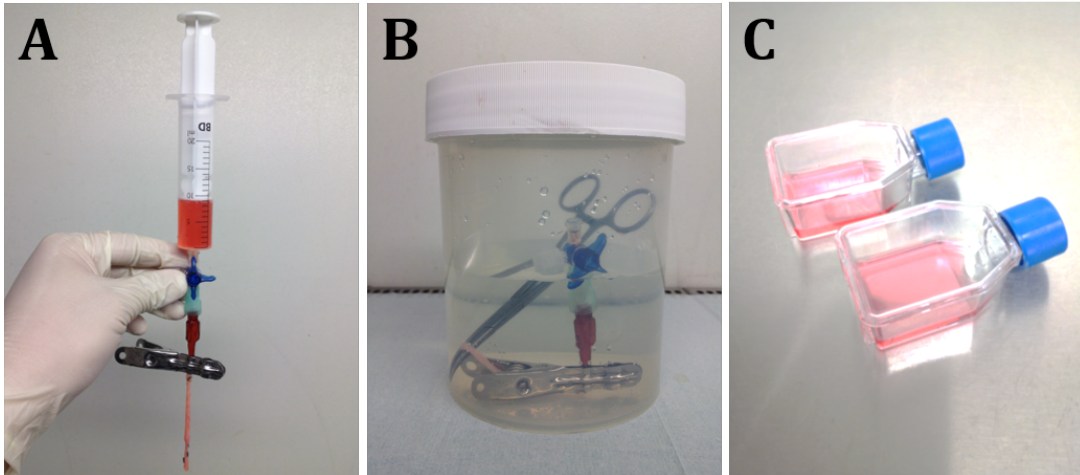


Abb. 5.1: Isolation der Endothelzellen Das Venensegment wird in einem ersten Schritt kanüliert. Eine Spülung mit einer entsprechenden Lösung ist ebenso nötig **(A)**. Die Vene wird mit Kollagenase aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt in 200 ml PBS bei 37°C **(B)**. Die Endothelzellen mit ECM werden auf zwei T12.5 ml Zellkulturflaschen aufgeteilt **(C)**.

Nachdem die EC isoliert wurden, konnte die Vene verwendet werden, um die FB zu isolieren. Dazu wurde eine Längsöffnung mit einem Skalpell¹⁴ vorgenommen. In einem weiteren Schritt wurde sie in etwa 1 x 1mm² große Segmente zerschnitten und in eine Petrischale¹⁵ überführt. Dort sind zuvor Silikonpunkte¹⁶ aufgetragen worden (Abb. 5.2). Ein zügiges Arbeiten war nötig, damit die FB-Segmente nicht austrocknen. Ein Tropfen M199 konnte ebenfalls zugegeben, um diesen Prozess zu verhindern. Auf jeweils vier Silikonpunkte wurde ein Deckglas¹⁷ platziert. Mithilfe einer Pinzette wurde es festgedrückt, um den Kontakt zur Petrischale herzustellen. Hierbei bestand die Möglichkeit, dass die

¹² Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

¹³ Axiovert 35, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany

¹⁴ Feather Safety Razor Co., LTD. Medical Division, Japan

¹⁵ Nunc. GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland

¹⁶ Fischer Elektronik GmbH und Co. KG, Lüdenscheid, Deutschland

¹⁷ Zefa - Laborservice GmbH, Harthausen, Deutschland

Venensegmente etwas breit gedrückt wurden. Seitlich unter das Deckglas wurden vorsichtig 10ml des Fibroblasten-Wachstumsmediums¹⁸ pipettiert. Dieses setzte sich aus 10% FCS und 0.2% Pen/Strep zusammen. Die FGM wurde nach fünf bis sieben Tagen das erste Mal gewechselt. Danach erfolgte der Wechsel an jedem dritten Tag.

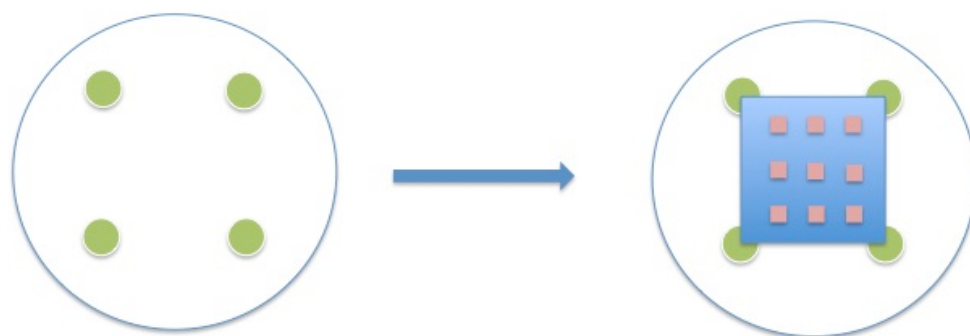


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der FB-Segmente in der Petrischale Auf die Petrischale wurden die 1 x 1mm² großen Venensegmente gegeben. Sie wurden mit einem Deckglas abgedeckt. Die Fixierung erfolgte mit jeweils vier Silikonpunkten.

5.1.2 Passagieren der Zellen

Bei Konfluenz war es nötig die Zellschicht zu passagieren. Danach konnten die Zellen in mehrere Zellkulturflaschen verteilt werden, sodass eine weitere Kultivierung möglich war (Abb. 5.3). Zum Ablösen der Zellen wurde eine Trypsin-Lösung verwendet. Die Menge war abhängig von der Größe der Kulturflaschen.

Zunächst ist das EGM beziehungsweise das FGM restlos verworfen worden. Anschließend wurde mit Phosphate Buffered Saline¹⁹ (PBS) gespült. Dieser Vorgang dauerte zwei Minuten und das PBS wurde danach komplett entfernt. Um die Zellanhaftung zu lösen, wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung²⁰ (1:20 in PBS) verwendet. Zur Inkubation wurden die Zellkulturflaschen für zwei Minuten in den Brutschrank gegeben. Auf diese Weise konnte die Lösung effektiv einwirken.

¹⁸ FGM: Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland

¹⁹ PBS: Biochrom AG, Berlin, Deutschland

²⁰ Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Die Zellablösung wurde mittels Lichtmikroskop kontrolliert. Gegebenenfalls sind die Zellen durch vorsichtiges Klopfen zusätzlich gelöst worden. Zum Reaktionsstop wurde eine M199/FCS-Mischung in die Zellkulturflasche gegeben. Die Lösung wurde mitsamt den Zellen, die sich abgelöst haben, in ein 50 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert. Abschließend ist der Überstand vorsichtig abpipetiert und das Zellpellet im EGM bzw. FGM resuspendiert worden.

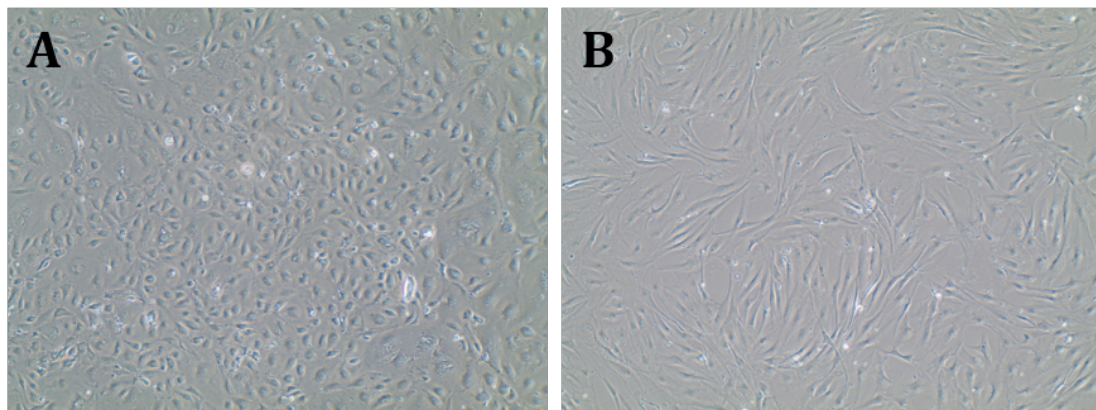


Abb. 5.3: Aufnahmen der konfluenten Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop Endothelzellen **(A)**. Fibroblasten **(B)**.

Die Zellsuspension ist dann in entsprechende Zellkulturflaschen gegeben und mit Kulturmedium aufgefüllt worden. Die Lösungen, die verwendet wurden, waren von der Flaschengröße abhängig, wie in Tabelle 5.1 ersichtlich.

Lösung \ Größe	Flasche T12.5 cm ²	Flasche T75 cm ²	Flasche T175 cm ²
PBS	6ml	12ml	14ml
Trypsin	1.5ml	3ml	5ml
Mischung von M199/FCS	7ml / 2ml	8ml / 3ml	9ml / 5ml
CGM für Ausfüllen der Flasche	4.5ml	16ml	30ml
Finale Wachstumsfläche	→ 1xT175cm ²	→ 2xT175cm ²	→ 4xT175cm ²

Tabelle 5.1: Mischungsverhältnisse zur Trypsinierung Die Lösungsmenge ist von der Größe der Zellkulturflasche abhängig.

5.1.3 Lagerung der Zellen

Zellen, die nicht direkt verwendet werden, lassen sich mittels Kryokonservierung aufbewahren. Die ersten Schritte der Kryokonservierung sind in Abschnitt 5.1.2 „Passagieren“ bereits beschrieben. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet jedoch mit Kryomedium resuspendiert. Dieses bestand aus 10% Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)²¹, 20% FCS und 70% des jeweiligen Kulturmediums. Eine zügige Arbeitsweise war aufgrund der Zytotoxizität des DMSO nötig. Zum Konservieren wurden jeweils ca. 7×10^6 Zellen in ein Kryoröhrchen²² transferiert. Der Einfrierprozess erfolgte bei -80°C . Um die Haltbarkeit zu verlängern, wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingelagert.

Beim späteren Auftauen sind die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt worden. Anschließend wurden die Zellsuspension in einer Mischung aus 9ml M199 und 4ml FCS verdünnt. Danach sind die Zellen in ein 50ml Röhrchen überführt und bei 500 RPM für fünf Minuten bei RT zentrifugiert worden. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Zellpellet in ECGM bzw. FGM resuspendiert. Schließlich konnten die Zellen in eine oder mehrere 175cm^2 -Zellkulturflaschen gegeben und die Kultivierung fortgesetzt werden.

5.2 Herstellung der Aortenklappenprothese

Die verwendete biohybride Aortenklappenprothese (BAP, $n = 6$) hat biologische und synthetische Komponenten. Makellose Homografts mit einem Durchmesser $25.5 \pm 0.76\text{cm}$ bildeten die Segel für die BAP. Die Wand der BAP bestand aus Polyurethan. Hier ist auch vom sogenannten Polyurethan Patch²³ die Rede.

²¹ DMSO: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

²² Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland

²³ PU: gesprühter Polyurethan, Vasomer®, Denkendorf, Germany

5.2.1 Auftauen der Homografts

Die kryokonservierten Homografts der Aortenklappen waren zur Lagerung dreifach in Plastikbeuteln eingeschweißt (Abb. 5.4A). In einem ersten Schritt mussten sie in einer Ringer-Lösung aufgetaut werden. Dies erfolgte bei 56°C. Zudem war es nötig, den äußeren Beutel zu entfernen. Die weiteren Beutel wurden schrittweise geöffnet (Abb. 5.4B). Dazu mussten die Bedingungen jedoch steril sein. Die Lagerung der Homografts bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte abschließend in 200ml M199 (Abb. 5.4C).

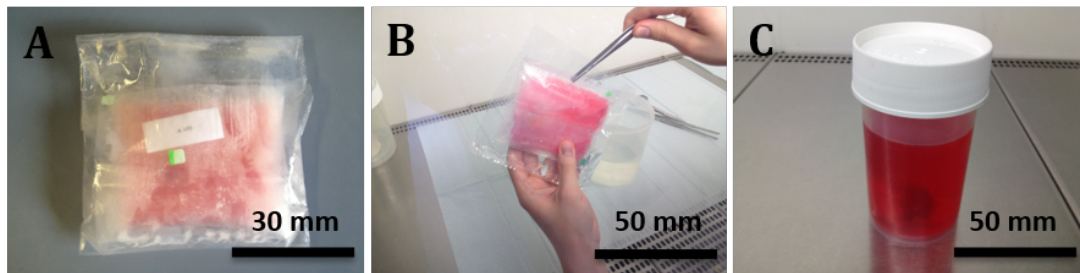


Abb. 5.4: Kryokonservierte Homograft und ihr Auftauprozess Dreifach verpacktes Homograft (A). Beutel des Homografts, der schrittweise geöffnet wird (B). Aufgetautes und in M199 gelagertes Homograft (C).

5.2.2 Einnähen

Zunächst musste das Homograft vorsichtig von innen nach außen gedreht werden (Abb. 5.5A). Im Anschluss wurde es zwischen zwei benachbarten Segeln in Längsrichtung aufgeschnitten (Abb. 5.5B). In einem weiteren Schritt mussten die drei Segel aus dem Homograft entfernt werden (Abb. 5.5C). Sie wurden anschließend in PBS gelagert. Hierdurch ist ein Austrocknen verhindert worden. Die Größe des sterilen PU umfasste 10 x 16cm². Auf dem PU wurden die Unterränder der drei Segel in kontinuierlicher Naht angenäht²⁴ (Abb. 5.5D). Danach erfolgte der exakte Zuschnitt des PU-Patches, entsprechend der Breite aller drei Segel (Abb. 5.5E). Abschließend wurden die linke und rechte Seite des PU so zurechtgelegt, dass ein Zylinder geformt wurde und sie sich leicht überlappt haben. Die Ränder sind in fortlaufender Naht zusammengenäht worden.

²⁴ Prolene® 5-0, Ethicon, USA

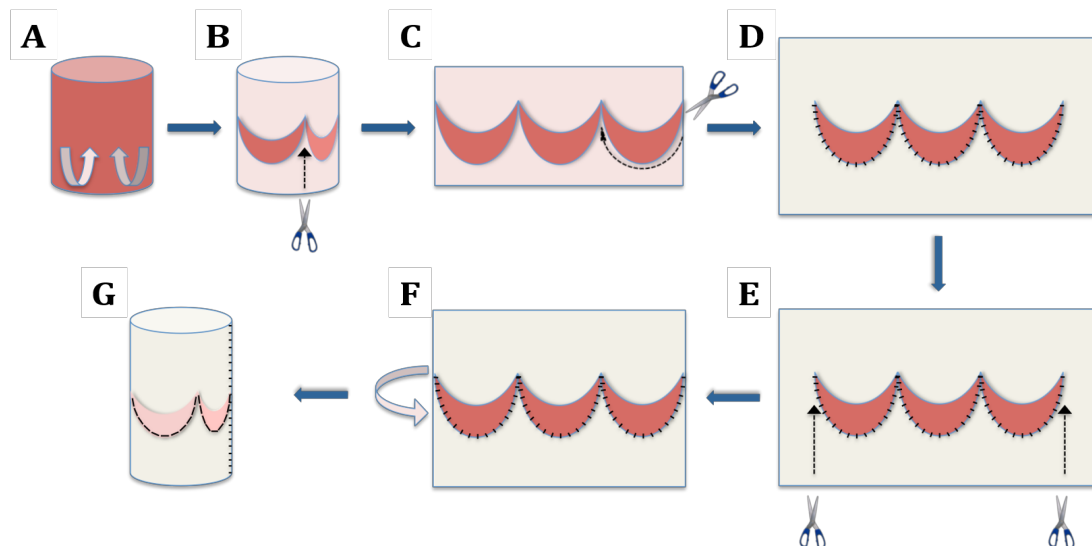


Abb. 5.5: Schematische Darstellung der Herstellung der BAP Das Homograft wird von innen nach außen gedreht. Danach wird es entlang der Linie aufgeschnitten, an der sich zwei benachbarte Segel berühren (**A, B**). Es werden drei Segel ausgeschnitten (**C**). Die Segel werden auf einen 10 cm x 16 cm großen PU-Patch gelegt und fortlaufend angenäht (**D**). Das PU wird entsprechend der Segelbreite zugeschnitten (**E**). Aus dem Patch wird ein Zylinder geformt. Die linke und rechte Seite des PU überlappen sich und werden so zusammengenäht (**F, G**).

5.2.3 Dezellularisation

Vor der Dezellularisation der BAP musste untersucht werden ob die eingesetzten Detergentien das PU angreifen oder verändern. Dazu wurden die PU in die Dezellularisierungslösung mit 0.5% Natriumdeoxycholate, 0.5% Natriumdodecylsulfat in PBS gegeben. Die PU-Stückchen hatten eine Größe von 2 x 2cm. Sie wurden in 400 ml Lösung gegeben. Damit die Lösung gleichmäßig wirken kann, wurde eine 3D-Rotatorplatte bei RT eingesetzt. Die behandelten Proben wurden anschließend für sechs Tage einmal am Tag mit PBS gewaschen. Im Anschluss fand die Auswertung mittels Rasterelektronenmikroskopie statt. Zur Verarbeitung der BAP sind die bereits erstellten Prothesen für 24 Stunden in 400ml Lösung gegeben worden. Danach wurden sie für sechs mal 24 Stunden in 400ml PBS gewaschen und abschließend in 250ml M199 bei 4°C aufbewahrt. Die Inkubation fand auf einer 3D-Rotatorplatte bei Raumtemperatur statt.

5.2.4 Fixierung der Prothesen

Zunächst ist ein Co-Cr-Stent mithilfe von Hegarstiften (Abb. 5.6A) schrittweise (5 mm, 12 mm, 20 mm) erweitert worden. Anschließend wurde die BAP

eingenäht und die gestenteten Prothesen (SBAP) mittels Einzelknopfnähten an einer Teflonhalterung fixiert. (Abb. 5.6B und C).

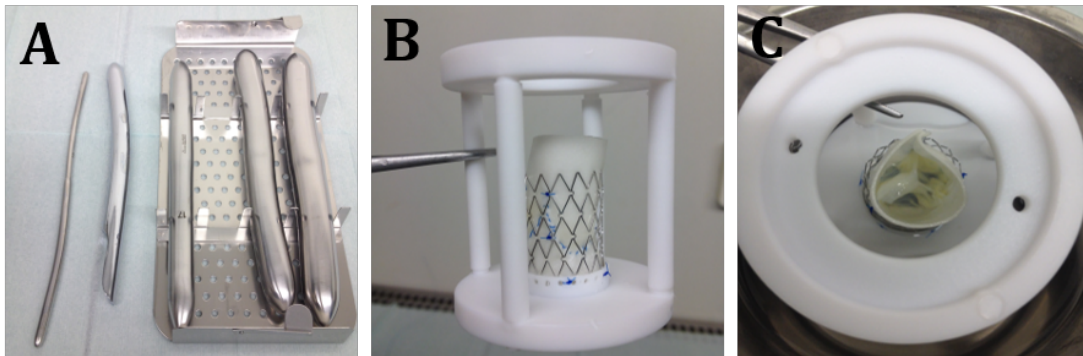


Abb. 5.6: Gestentete und auf Teflonhalterung fixierte BAP Hegarstifte zur Dehnung des Stents (A). in Teflonhalterung befestigte SBAP (B). Bei Betrachtung von oben lassen sich geschlossene Segel der Prothese erkennen (C).

5.2.5 Beschichtung und statische Kultivierung

Die SBAP-Oberfläche betrug im Durchschnitt $60.28 \pm 2.05\text{cm}^2$. Zur Zellbeschichtung wurden 0.75×10^6 Zellen pro 1cm^2 benötigt. Das macht für die gesamte äußere und innere Fläche einer SBAP 45×10^6 Zellen. Die Zellanzahl konfluenter FB liegt in einer $T175\text{cm}^2$ -Zellkulturflasche bei etwa 3.5×10^6 . Die Anzahl von EC beläuft sich auf etwa 6×10^6 Zellen pro Kulturflasche. Zuerst wurden die FB von fünfzehn $T175\text{cm}^2$ -Flaschen trypsiniert, damit eine Beschichtung erfolgen kann. Sie wurden noch zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Zählung der resuspendierten Zellen. Damit die Zellen gezählt werden konnten, wurde Trypanblau²⁵ mit den Zellen verdünnt. Das Verhältnis lag hier bei 1:6. Für die Zählung wurde ein Hemocytometer verwendet. Die Gesamtanzahl der Zellen kann wie folgt bestimmt werden:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Zellzahl}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000 \times \text{Volumen des Mediums}$$

Zur Zellbeschichtung wurden die SBAP mit der Zellsuspension (entsprechend der Zellzahl) in einen speziellen Besiedelungszyylinder gegeben. Dies erfolgte

²⁵ Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany

unter sterilen Bedingungen. Für den Vorgang sind die Zellen, die benötigt wurden, zusammen mit dem Medium vorsichtig in den Zylinder überführt worden. Der Besiedelungszylinder wurde anschließend an einem 3D-Rotationsgerät befestigt. Damit sich die Zellen auf alle Bereiche der SBAP verteilen konnten, drehte sich das Gerät drei Minuten lang, dann stoppte es für 30 Minuten. Die Zelladhäsion umfasste 24 Stunden und erfolgte bei 37°C (Abb. 5.7).

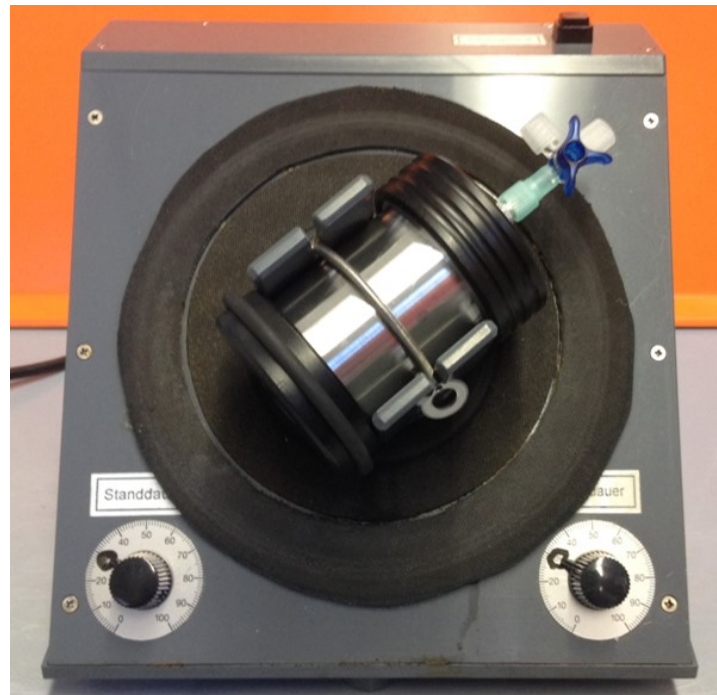


Abb. 5.7: 3D-Rotationsgerät mit Beschichtungszylinder Der Beschichtungszylinder dreht sich drei Minuten lang und stoppt dann für 30 Minuten. Der Besiedelungsvorgang dauert insgesamt 24 Stunden.

Eine weitere Zellzählung erfolgte nach 24 Stunden in dem Zellkulturmedium. Hierbei wurden vitale von letalen Zellen abgegrenzt. So konnte die Zahl der angehafteten Zellen bestimmt werden. Danach wurden die SBAP in ein steriles Glasgefäß mit 400ml FGM gegeben. Dort wurden sie für sechs Tage bei 37°C statisch gelagert. Anschließend wurden die EC in einem gleichen Verfahren beschichtet. Hierfür wurden zehn 175cm² große Flaschen verwendet. Eine Probe wurde nach der Beschichtung und statischen Kultivierung mit EC entnommen.

5.3 Präkonditionierung, TAVI-Simulation und Perfusion

5.3.1 Präkonditionierung

Der Konditionierungsbioreaktor (KBR, Abb. 5.8A) wurde gemeinsam mit der TU München entwickelt. Er ermöglicht die Zellkonditionierung unter pulsatilen Flussbedingungen. Der KBR wird mit einer computergesteuerten Antriebseinheit mittels eines Schlauchs pneumatisch verbunden (siehe Abb. 5.8B). Die Antriebseinheit setzt sich aus folgenden Elementen zusammen: Steuereinheit (Abb. 5.8B-1), linearer Antriebsmotor mit Zylinder (Abb. 5.8B-2) und Manometer (Abb. 5.8B-3). Eine „hin-und-her“ Bewegung erzeugt über einen Kolben einen Luftdruck (Abb. 5.8B). Für die Steuerung der Bewegung ist ein Computer zuständig. Über einen Schlauch wird der Luftdruck an den Reaktor weitergeleitet. Über die Silikonmembran (Abb. 5.8A-2) entsteht eine pulsatile Bewegung im angrenzenden Medium. Der KBR besteht aus den biokompatiblen und sterilisierbaren Materialien Gummi (für Dichtungsringe), Silikon, Plexiglas® (Polymethylmethacrylat) und Teflon® (Polytetrafluorethylen). Das Öffnen und Schließen der eingesetzten Herzklappe kann über die Monitoringeinheit endoskopisch festgehalten werden. Zur Erhaltung der Sterilität im KBR war der Innenraum an dieser Stelle mit einer dünnen Kunststoffscheibe abgeschlossen. Vor Benutzung wird der KBR gas-sterilisiert. Die gesamte Konditionierung findet im Brutschrank statt um physiologische Bedingungen zu erhalten.

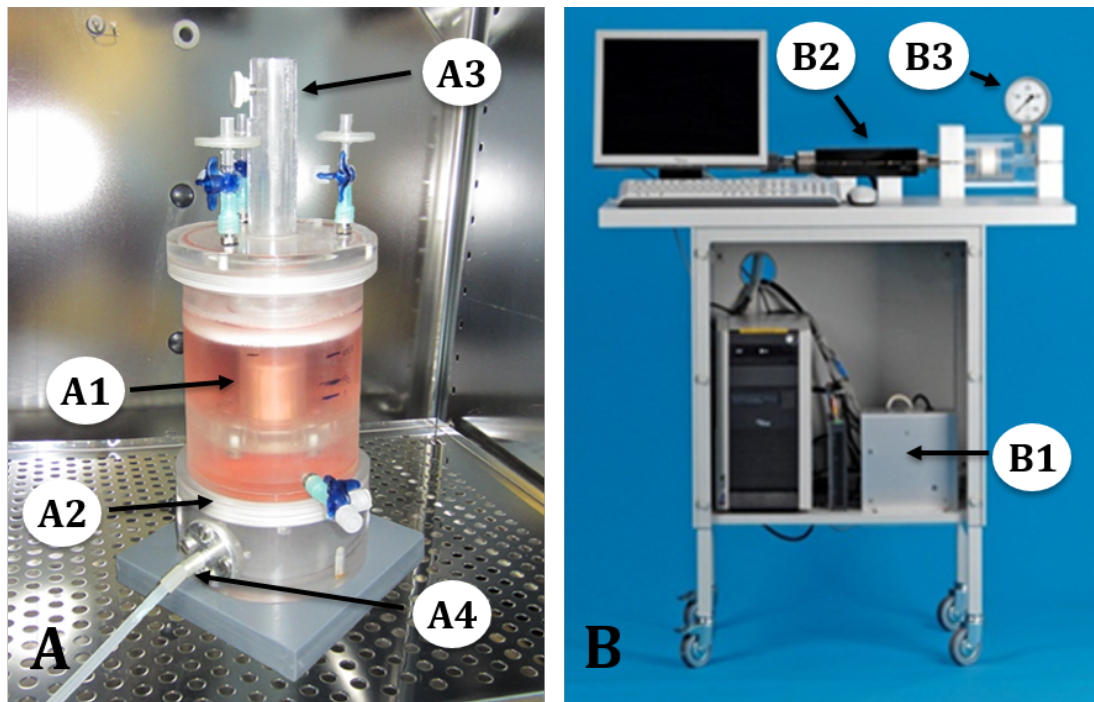


Abb. 5.8: Konditionierungsbioreaktor Konditionierungsbioreaktor für pulsatile Präkonditionierung und Perfusion im Brutschrank. Die SBAP ist während der Konditionierung innerhalb von 400 ml EGM lokalisiert (A1); Basiseinheit besteht aus einer Silikonmembran, um das Medium in eine pulsatile Bewegung zu versetzen (A2); Mittels Monitoringeinheit kann das Öffnen und Schließen der SBAP dokumentiert werden (A3); Anschluss der KBR per Schlauch an Antriebseinheit (A4). Computergesteuerte Antriebseinheit: Steuereinheit (B1); Linearer Antriebsmotor und pneumatischer Zylinder werden miteinander verbunden (B2); Manometer gibt aktuellen Druck wieder (B3).

Nach der statischen Kultivierung der SBAP erfolgte die Konditionierung im KBR. Diese wurde bei 500ml/min durchgeführt und dauerte fünf Tage. Die Dokumentation der Funktionalität der SBAP erfolgte endoskopisch.

5.3.2 TAVI-Simulation

Nach Beendigung der fünftägigen Konditionierung wurde die SBAP herausgenommen und die TAVI-Simulation gestartet. Hierzu musste der Teflonring entfernt werden. Zusätzlich ist eine Probe von den obersten Teilen der SBAP entnommen worden. Danach kam ein Ballonkatheter mit einem Durchmesser von 20mm zum Einsatz, der in die SBAP eingeführt wurde. Die SBAP wurde bis auf 10mm gecrimpt. Dafür wurde ein kommerziell erhältlicher

Crimper²⁶ verwendet (Abb. 5.9A und B). Die gecrimpte SBAP wurde schließlich in den Konditionierungsbioreaktor getaucht um ein Austrocknen zu verhindern. Dieser war mit ECM gefüllt. Der Vorgang dauerte zehn Minuten. Schließlich erfolgte die Aufdehnung der SBAP mittels Ballonkatheter²⁷ auf 20mm (Abb. 5.9C). Zu diesem Zeitpunkt ist eine weitere Probe entnommen worden.

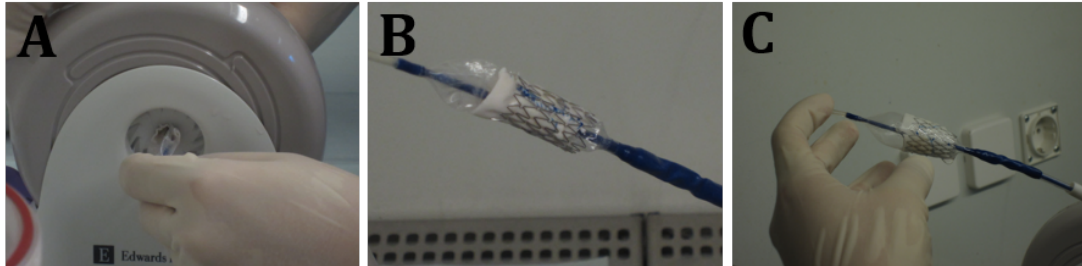


Abb. 5.9: Crimpingsimulation Crimping der SBAP im Querschnitt auf etwa 1 cm **(A)**. Status der BAP nach dem Crimpingvorgang **(B)**. BAP, die durch den Ballonkatheter dilatiert wurde **(C)**.

5.3.3 Perfusion

Die Teflonhalterung wurde vor der TAVI-Simulation entfernt. Dies war zum Crimpen und erneuten Dilatieren der SBAP nötig. Für die anschließende Perfusion wurde die SBAP in eine Halterung eingesetzt. Diese bestand aus Plexiglas (Abb. 5.10). Im Anschluss erfolgte die Perfusion im KBR bei 1100ml/min. Dieser Vorgang dauerte zwei Tage.

²⁶ Edwards Lifesciences, Irvine, CA, USA

²⁷ Edwards Lifesciences, Irvine, CA, USA

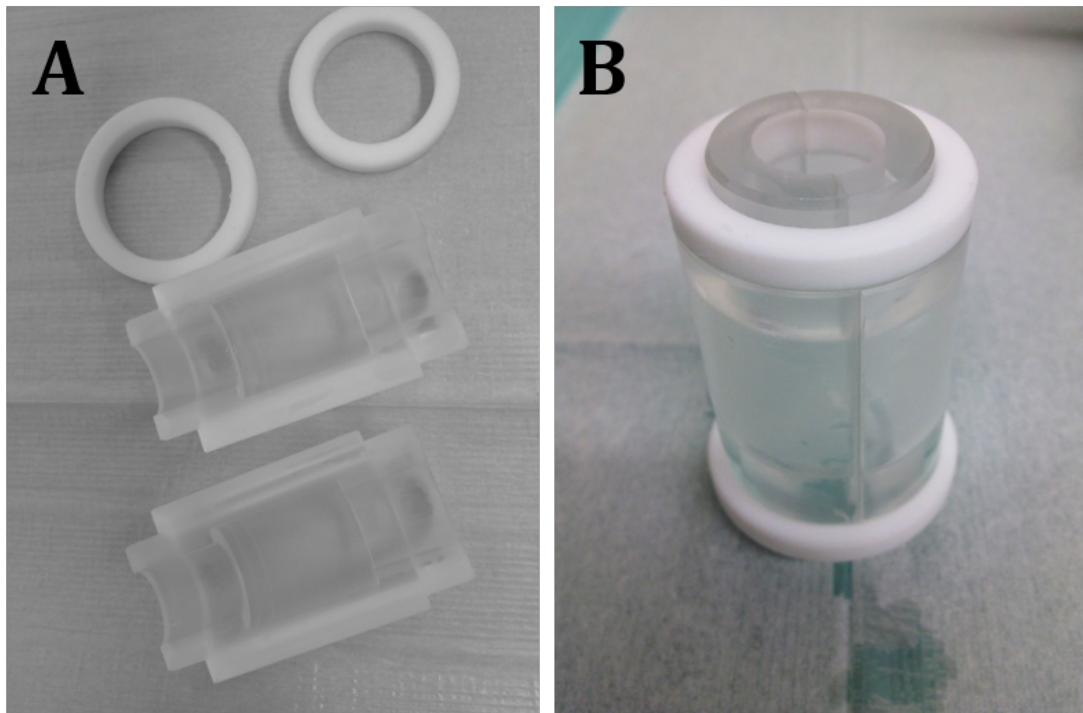


Abb. 5.10: Halterung der BAP für die re-Perfusion Die aus zwei symmetrischen Plexiglaskörpern und zwei Ringen bestehende Halterung **(A)**. Zusammengesetzte Haltevorrichtung **(B)**.

Nach Abschluss der Perfusion wurde die BAP für die Analyse vorbereitet. Dazu sind Proben der supravulvulären, valvulären und subvalvulären Regionen sowie den Segeln genommen worden (Abb. 5.11).

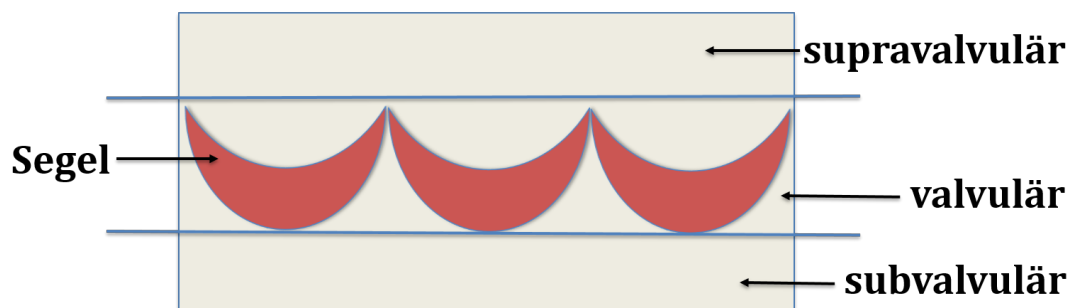


Abb. 5.11: Schematische Darstellung der Probenentnahme nach der re-Perfusion Die Proben wurde aus vier unterschiedlichen Bereichen entnommen

6. Analyse

In diesem Kapitel werden die Analysemethoden der Studie beschrieben. Die Rasterelektronenmikroskopie, endoskopische Aufnahmen, Live/Dead-Färbung® und Immunzytochemie/Immunhistochemie wurden zur Analyse der SBAP und der Zellen eingesetzt. Dazu wurden jeweils Proben einer Größe von 0.5cm x 2cm entnommen. Dies erfolgte nach der statischen Kultivierung mit EC, vor und nach der TAVI-Simulation. Die Entnahme stammte vom oberen Abschnitt jeder SBAP. Die Proben nach der Perfusion entsprachen vier Bereichen der SBAP: supravulvulär, vulvulär, subvulvulär und Segel (Abb. 5.11).

6.1. Endoskopische Aufnahme

Die Funktionalität der SBAP wurde während der zwei Konditionierungsphasen digital mit Hilfe eines Endoskops dokumentiert. Jeweils zu Beginn und am Ende einer Konditionierungs- und Perfusionsphase sind mehrminütige Videosequenzen aufgenommen und später analysiert worden. Die Suffizienz der SBAP sowie deren Öffnungs- und Schließverhalten wurden evaluiert.

6.2. Rasterelektronenmikroskopie

6.2.1 Allgemeines

Mithilfe einer Rasterelektronenmikroskop-(REM)-Aufnahme ist eine bis zu 1.000.000-fach vergrößerte Darstellung möglich. Zu den Hauptkomponenten des REM zählen Säule und Probenkammer sowie Bildschirm, Controller und Vakuumpumpe. In der Säule ist oben eine sogenannte Glühkathode befestigt. Sie wird erhitzt und erzeugt Elektronen, die in einem magnetischen Feld mit einer Spannung emittiert werden. Diese entsteht durch eine Anode, die unterhalb der Glühkathode liegt. Die Beschleunigung der Elektronen findet nach unten Richtung Proben statt. Eine elektromagnetische Sammellinse hilft bei der Vereinigung der Elektronen. Sie werden zu einem sehr feinen Elektronenstrahl

gebündelt. Sobald er auf Elektronen des Objekts, die sich in der Probenkammer befinden, trifft, kommt es zur Freisetzung dieser Elektronen (Sekundärelektronen). Diese werden im Anschluss von einem Detektor aufgefangen. Hierin enthalten sind Informationen zu den Proben. Dazu gehören beispielsweise Oberflächentopographie und Zusammensetzung. Die Bewegung des Elektronstrahls ist rasterartig. Hieraus ergibt sich ein Bild von den Proben, das auf dem Monitor gut zu erkennen ist. Eine REM-Untersuchung ist nur unter Hochvakuumbedingungen in der Probenkammer möglich. Der Grund dafür ist, dass die Atome der Raumluft Artefakte bilden würden.

Um die Probe für das REM vorzubereiten, sind vier Schritten nötig: Fixieren, Dehydrieren, Trocknen und Sputtern. Durch das Fixieren behalten die Zellträger ihre Struktur und Stabilität bei. Die Flüssigkeit, die in der Probe verblieben ist, würde bei der unter Hochvakuum durchgeführten REM-Aufnahme zu einem Verdampfen sowie einer Beschädigung der Probe führen. Das soll verhindert werden. Dazu wird die Probe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mittels CO₂ kontrolliert kritisch-punkt-getrocknet. CO₂ liegt bei bestimmten Temperatur- und Druckbedingungen, dem sogenannten kritischen Punkt, sowohl in flüssiger als auch in gasförmiger Form vor und es lassen sich die Phasen nicht mehr unterscheiden. Werden Temperatur und Druck erhöht, tritt der Stoff von der überkritischen Flüssigkeitsphase in die Gasphase über. Der kritische Punkt liegt bei 31°C und 73,8 bar. Hingegen würde es bei einer Trocknung unter RT zu einer Oberflächenspannung kommen. Die Folge wäre ein Schrumpfen oder eine Beschädigung der Probenstruktur.

Im letzten Schritt, dem sogenannten Sputtern, werden die Probenoberflächen mit leitfähigem Material beschichtet. In den meisten Fällen wird Gold verwendet. In diesem Fall werden einzelne Goldatome unter Hochvakuum auf die Proben gezogen, sodass eine leitfähige Goldschicht entsteht.

6.2.2 Fixieren

Die entnommenen Proben wurden zuerst in einer FIX II Lösung bei 4°C fixiert. Die Lösung besteht aus 456ml Ampuwa²⁸, 43ml Glutaraldehyd²⁹ 25%

²⁸ Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germany

(Endkonzentration 2%), 0.75ml 1 NHCL³⁰ und 5.65g Na-CaCO³¹. Dieser Vorgang dauert mindestens 48 Stunden.

6.2.3 Dehydrieren

Im nächsten Schritt sind die Proben in einen Metallbehälter gegeben worden. Zunächst wurden sie in vergälltem 30%, 50%, 70%, 90%, 96%-igem Ethanol jeweils für 10 Minuten entwässert. Am Ende wurden die Proben in unvergälltes 99.9%-iges Ethanol gegeben und bei -20°C gelagert.

6.2.4 Kritisch-Punkt-Trocknen

Beim Kritisch-Punkt-Trocknen³² erfolgte im ersten Schritt der Austausch des Ethanols mit flüssigem CO₂ unter hohem Druck bei RT. Dieser Vorgang läuft schrittweise ab. Anschließend wird das CO₂ auf 42°C erhitzt, um einen Druck von 80 bar zu erhalten. Bei 31°C und 73,8 bar erreicht das CO₂ seinen Kritischen-Punkt mit gleicher flüssiger und gasförmiger Phase. Wenn das CO₂ anschließend ausströmt, verringert sich auch der Druck. Um Luftverwirbelungen zu vermeiden wurden die Proben über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten entlüftet. Im Anschluss erfolgte die Entnahme der getrockneten Proben.

6.2.5 Sputtern

Mit einem Skalpell wurden die getrockneten Proben vorsichtig halbiert. Je eine Oberseite und Unterseite sind anschließend auf einem klebenden Probenhalter fixiert worden. Im Anschluss mussten die Proben in die Sputterkammer³³ gegeben werden. Unter geschlossenen Bedingungen konnte ein leichtes Vakuum (10⁻⁵mbar) aufgebaut werden. Ein schrittweiser Austausch mit Argon beseitigte verbleibende Bestandteile der Raumluft. Der Sputtervorgang ist bei 570V und

²⁹ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany

³⁰ ICN GmbH, Northeim Germany

³¹ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany

³² CPD 30, Bal-Tec GmbH, Schalksmuehle, Germany

³³ Sputter Coater, SCD 50, Bal-Tec GmbH, Schalksmuehle, Germany

28mA für 180s durchgeführt worden. Auf diese Weise ist es möglich, die Proben effektiv mit Gold zu beschichten.

6.2.6 REM-Aufnahme

In der Probenkammer des Rasterelektronenmikroskops³⁴ wurden die Proben fixiert. Danach wurde ein Vakuum aufgebaut. Die Bilder sind bei 100- und 1000-facher Vergrößerung aufgenommen und digital gespeichert worden.

6.3. Immunhistochemie

6.3.1. Allgemeines

Die Immunhistochemie (IHC) ist als eine Färbemethode bekannt. Hierbei werden bestimmte Proteine oder Strukturen sichtbar gemacht, indem markierte Antikörper (AK) verwendet oder AK-Komplexe farblich markiert werden. Jede Zelle präsentiert eine Vielzahl an unterschiedlichen Antigenen. Während der Inkubation bindet ein spezifischer AK an einen bestimmten Typ von Antigenen (Epitop) in einem histologischen Gewebeschnitt. In der IHC spricht man hier auch vom „Primärantikörper“. Er kann von Tierarten wie der Maus oder dem Kaninchen stammen und mono- oder polyklonal sein. Der AK sollte eine hohe Affinität sowie Spezifität aufweisen, d.h. es dürfen keine Kreuzreaktionen mit anderen Epitopen auftreten. Werden Farbenzyme hinzugegeben, ist das Protein, das untersucht werden soll, mikroskopisch zu erkennen. Dieses Vorgehen kann auch als sogenannte „Direkte Methode“ bezeichnet werden. In der indirekten und kostengünstigeren Methode muss nach der Antigen-Primärantikörper-Reaktion ein weiterer AK (Sekundärantikörper) hinzugefügt werden. Dieser richtet sich gegen die Spezies des ersten AK und ist an ein Enzym zur Farbreaktion gekoppelt. Eine anschließende Färbung mit Hämalaun und Peroxidase erlaubt die mikroskopische Erfassung der Proteinstruktur sowie deren Lokalisation.

³⁴ *Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany*

In dieser Studie wurden neun AK verwendet: α -Actin³⁵, CD-31 (Cluster of Differentiation)³⁶, Collagen IV³⁷, Connexin-43³⁸, Fibronectin³⁹, ICAM (Intracellular Adhesion Molecule)⁴⁰, SMC-Myosin (Smooth Muscle Cell)⁴¹, TE-7 (Human Thymic Endothelial Cells)⁴² sowie VE-Cadherin (Vascular Endothelial Cadherin)⁴³. Sie mussten in einer unterschiedlichen Verdünnungsrate und mit einer anderen Verdünnungslösung angewendet werden⁴⁴.

Mit dem Einsatz der unterschiedlichen AK konnten verschiedene Zellen und Reaktionen dargestellt und nachgewiesen werden. EC können mittels CD-31 und VE-Cadherin nachgewiesen werden. Die immunmodulatorische Reaktion der Zellen lässt sich mit ICAM erkennen. Connexin-43 und SMC-Myosin verweisen auf die interzelluläre Verbindung. Mit Hilfe von Collagen-IV und Fibronectin ist es möglich, die extrazelluläre Matrix (EZM) darzustellen. TE-7 zeigt die Präsenz von FB an.

6.3.2. Zellkultur

Um die kultivierten Zellen immunzytologisch zu bestimmen, wurde jeweils eine Probe von EC und FB entnommen. Dieser Vorgang wurde bei jeder Zelllinie durchgeführt. 0.5ml Zellsuspension wurde nach dem Passagieren (Kap. 5.1.2) abpipettiert und in eine 8-Well-Chamber-Slide⁴⁵ überführt. Die Konfluenz sowie Adhärenz der Zellen musste sichergestellt werden. Dafür ist die Slide eine Stunde zu inkubiert worden. Nachdem das Medium entfernt wurde, konnte der Objektträger entsprechend gelagert werden. Hierzu diente 96%-iges Ethanol bei

³⁵ 0.55 μ g/ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany, Verdünnung: 1:100

³⁶ Cluster of differentiation 31, 205 μ g/ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany, 1:20

³⁷ 9 μ g/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany, 1:600

³⁸ 12.5 μ g/ml; Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Germany, 1:80

³⁹ 0.2 μ g/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany, 1:3000

⁴⁰ Intracellular adhesion molecule, 1:300; Millipore GmbH, Schwalbach / Ts., Germany, 1:150

⁴¹ Smooth muscle cell myosin, 19 μ g/ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany, 1:50

⁴² Thymic epithelial cells 7, 2 μ g/ml; Millipore GmbH, Schwalbach / Ts., Germany, 1:150

⁴³ vascular endothelial cadherin, 10 μ g/ml; Beckmann Coulter Inc., Marseille, France, 1:40

⁴⁴ Dako Deutschland, GmbH, Hamburg, GER

⁴⁵ BD Falcon, Erembodegem, Belgium

unter -80°C. Zur Färbung wurde 30%-iges H₂O₂⁴⁶ eingesetzt, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Nunmehr konnte der erste und zweite Antikörper dazugegeben werden. Für die FB-Anfärbung wurden α -Actin, CD-31, Collagen-IV, Fibronectin und SMC-Myosin genutzt. Für die EC-Anfärbung wurden TE-7 und CD-31, VE-Cadherin und Connexin-43 sowie TE-7 eingesetzt. Zum Erhalt von Negativkontrollen wurden jeweils alle AK bei allen Zelltypen eingesetzt.

6.3.3. Vorbereitung der histologischen Proben

Wurde eine Probe entnommen (siehe Anfang Kapitel 5), ist sie zunächst für mindestens 48 Stunden gelagert worden. Die Aufbewahrung erfolgte in 4%-igem Formalin⁴⁷ bei 4°C. Zur besseren Handhabung sind die Proben außerdem für zwei Minuten in Mayer's Hemalaun-Lösung⁴⁸ angefärbt worden. Anschließend fand mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe bis 96% die Entwässerung der Proben statt. Im Anschluss wurden die Proben in Roti-Histol⁴⁹ gelagert.

6.3.4. Paraffinschnitte

Es wurden Paraffineinbettungen und -schnitte angefertigt, damit die Proben auf die Objektträger gelegt und mikroskopisch untersucht werden konnten. Die Proben, die in Xylol gelagert wurden, sind zunächst für 24 Stunden in ein Paraffinbad gelegt und dann ausgegossen worden. Proben konnten anschließend durch ein Mikrotom auf eine Dicke von 10 μ m geschnitten und auf Objektträger gezogen werden. Es war nötig, die Objektträger über Nacht zu trocknen. Dies erfolgte bei 40°C im Wärmeschrank.

Die Entparaffinierung erfolgte mit Roti-Histol, absteigender Ethanolreihe und anschließender Spülung mit destilliertem Wasser⁵⁰ (a.d.). Die Spülung mit a.d. und PBS dauerte jeweils nur 2 x 3 Minuten. Anschließend war es nötig, die

⁴⁶ *Sigma Aldrich Chemie, GmbH, Taufkirchen, Germany*

⁴⁷ *Microcos GmbH, Garching, Germany*

⁴⁸ *Merck KGaA, Darmstadt, Germany*

⁴⁹ *Roth, Karlsruhe, Germany*

⁵⁰ *Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d. H., Germany*

Proben in 10ml PBS mit 0.5% Triton X⁵¹ zu permeabilisieren. In einem weiteren Schritt wurden die Proben demaskiert. Aufgrund der unterschiedlichen Antikörper wurden verschiedene Lösungen verwendet. Es gab auch Unterschiede hinsichtlich der Inkubationszeit sowie des pH-Werts. Die Vorgehensweise ist Tabelle 6.1 zu entnehmen.

Antikörper	Demaskierung
α-Actin	10min in Tris/EDTA-Lösung, pH: 9.0 erwärmen
CD-31	15min in Tris/EDTA-Lösung, pH: 9.0 erwärmen
Collagen IV	3min Proteinase (vor Gebrauch 1:40 mit a.d. verdünnen, das entspricht einer Endkonzentration von 25µg = 2.8mU/ml) bei RT (in feuchter Kammer)
Connexin-43	7min in Target Retrieval-Lösung, pH: 6.0 erwärmen
Fibronectin	3min Proteinase (vor Gebrauch 1:40 mit a.d. verdünnen) bei RT (in feuchter Kammer)
ICAM	10min in 0.1mM EDTA-Lösung, pH: 8,0 erwärmen
SMC-Myosin	7min in Target Retrieval-Lösung, pH: 6.0 erwärmen
TE-7	10min in 0.1mM EDTA-Lösung, pH: 8.0 erwärmen
VE-Cadherin	10min in Target Retrieval-Lösung, pH: 6.0 erwärmen

Tabelle 6.1: Demaskierung der Antikörper

Die Blockierung erfolgte mit 0.4% H₂O₂⁵² in PBS. Anschließend wurden die Proben mit dem jeweiligen AK für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach ist die Inkubation mit HRP Streptavidin Label⁵³ und AEC-Peroxidase-Substrat⁵⁴ durchgeführt worden. Letzteres bestand aus 5ml a.d., zwei Tropfen Pufferlösung, drei Tropfen Farbsubstrat und zwei Tropfen H₂O₂. Der Vorgang umfasst zehn Minuten und fand in einer „feuchten Kammer“ statt. Der Zellkern wurde abschließend mit Hämalaun für vier Minuten bei RT gegengefärbt. Danach war es nötig, die Objektträger mit Leitungswasser für mehrere Minuten zu spülen. Der Objektträger wurde mit einem Deckglas und wässrigem Eindeckmedium⁵⁵

⁵¹ Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany

⁵² Sigma Aldrich Chemie, GmbH, Taufkirchen, Germany

⁵³ Medac GmbH, Hamburg, GER

⁵⁴ Vector Laboratories INC, California, USA

⁵⁵ Dako Deutschland, GmbH, Hamburg, GER

eingedeckt. Für die negative Kontrolle wurde ein Objektträger verwendet, der ohne AK inkubiert wurde.

6.5 Live/Dead Färbung®

Nach der TAVI-Simulation und Perfusion erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Zellvitalität. Dazu war es nötig, die Proben kurz in 500µl EGM zu lagern. Das EGM wurde dann mit 1µl Propidiumiodid⁵⁶ und 0.5µl Syto 9⁵⁷ angereichert. Das Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axio Observer⁵⁸ kam für die Untersuchung zur Anwendung. Letale Zellen wurden durch das Propidiumiodid bei einer Wellenlänge von 485nm rot dargestellt. Vitale Zellen konnten durch Syto9 bei einer Wellenlänge von 540nm untersucht und grün dargestellt werden.

⁵⁶ Sigma-GmbH, Steinheim, Germany

⁵⁷ Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany

⁵⁸ Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany

7. Ergebnisse

7.1. Funktionalität der SBAP

Während der Konditionierung und Perfusion erfolgte per Endoskop die digitale Aufnahme der Funktionalität der SBAP. Bei niedrigen Flussbedingungen (500ml/min) zeigt sich ein insuffizientes Verhalten beim Öffnen und Schließen (keine Abbildung). Die Segel schließen jedoch vollständig, sobald eine höhere Flussrate erreicht worden ist (Abb. 7.1A). Hierdurch wird ein unidirektionaler Strom im Medium erzeugt. Der Öffnungsvorgang konnte schrittweise dokumentiert werden (Abb. 7.1B-D). In einem weiteren Schritt ist mittels Bild- und vektorbasierter Analyse die Öffnungsflächen kalkuliert worden (Abb. 7.1E-H). Alle Proben zeigen eine maximale Öffnung von $49,1 \pm 10,7\%$ ($1,55\text{cm}^2$). Die minimale Öffnung beträgt $0,17 \pm 0,33\%$ ($0,54\text{mm}^2$). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es während der Perfusion zu keiner Insuffizienz kommt.

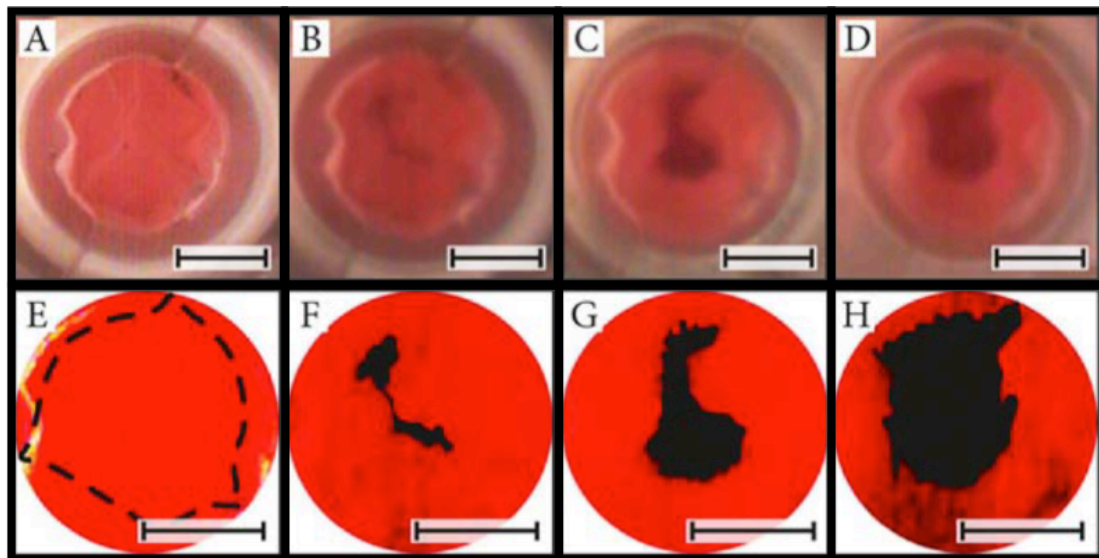


Abb. 7.1: Endoskopische Aufnahmen während Perfusion und vektorbasierte Analyse Kompletter Klappenschluss ohne Insuffizienz **(A)**, öffnende SBAP **(B, C)** und maximaler Öffnungszustand **(D)**. In einer vektorbasierten Analyse zeigt sich eine minimale Öffnung von $0,17 \pm 0,33\%$ und eine maximale Öffnung von $49,1 \pm 10,7\%$ **(E-H)**. Die gestrichelte Linie weist auf die Öffnungsfläche der SBAP hin, die maximal möglich ist **(E)**. Maßstab = 10mm. (Quelle: Originalartikel)

7.2. Rasterelektronenmikroskopie

7.2.1. Dezellularisation

Bei dem nativen PU ist eine netzartige und homogene Struktur zu erkennen (Abb. 7.2A). Die gesprühten Fasern zeigen in keine bestimmte Richtung bzw. besitzen keine bestimmte Anordnung. Ihr Durchmesser liegt zwischen 0.2 und 2µm. Unter nicht-idealen Bedingungen kann es im Herstellungsprozess zu flächigen Verklebungen der Fasern kommen, den sog. Schmelzpunkten. Diese Merkmale sind in den unbesiedelten PU-Proben nur sehr vereinzelt vorhanden.

Bei dem behandelten PU ist kein Unterschied zwischen den einzelnen Proben zu erkennen. Die in einer Dezellularisierungslösung für einen unterschiedlichen Zeitraum (1 bis 7 Tage) aufbewahrten Proben zeigen keine beschädigten Stellen (Abb. 7.2 B, C und D).

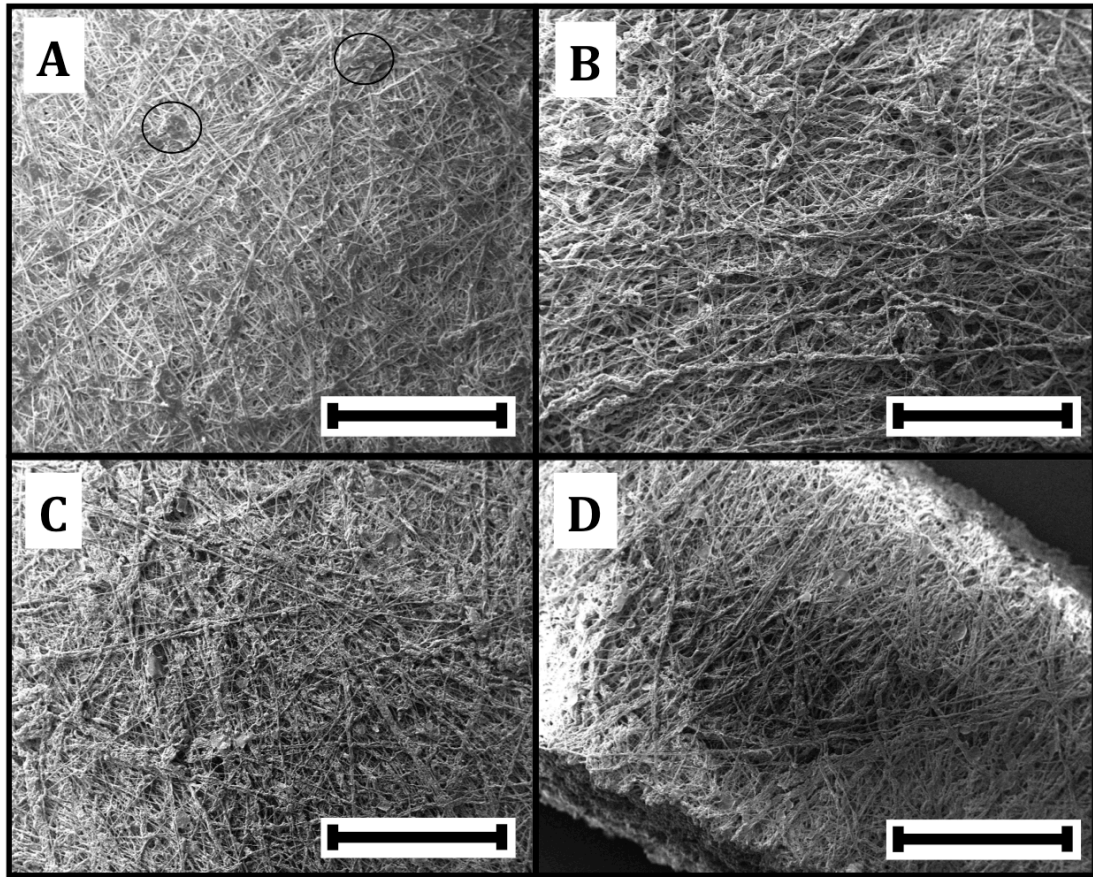


Abb. 7.2: Natives und dezellularisiertes PU Das native PU zeigte eine homogene netzartige Struktur. **(A)** Es gibt einige wenige Schmelzpunkte, die durch den Herstellungsprozess hervorgerufen werden (**A: schwarze Kreise**). Dezellularisiertes PU nach 1 Tag **(B)**, 4 Tagen **(C)** und 7 Tagen. **(D)** Wie bei der Nativprobe wird hier eine faserartige Struktur ohne beschädigte Stellen sichtbar. Maßstab = 500µm

7.2.2. Beschichtung und Konditionierung

Nach der Besiedelung mit FB + EC, lässt sich eine homogene und konfluente Zellschicht auf der PU-Probe erkennen (Abb. 7.3A). Es sind im Vergleich zur Nativprobe keine Lücken bzw. netzartigen Strukturen sichtbar. Das darunterliegende PU lässt sich an einigen Stellen im Relief erahnen. Die Zellschicht ist gleichmäßig verteilt und glatt. Die Zellen weisen keine bestimmte Anordnung auf. Es treten keine Zellagglomerate oder abgelösten Zellen auf. Es gibt kreisförmige und leicht erhobene Stellen. Sie können Folge der EC-Proliferation sein.

Nach der Konditionierung ist die Zellschicht immer noch homogen und konfluent. Es ist eine EC-typische pflastersteinartige Oberfläche sichtbar (Abb. 7.3B). Ebenfalls können spindelförmige FB nachgewiesen werden. Diese haben sich im Laufe der Zeit vermehrt und verdickt. Außerdem sind teilweise Risse erkennbar, welche Folge der Kritisch-Punkt-Trocknung sein können (Abb. 7.3B; schwarze Pfeile).

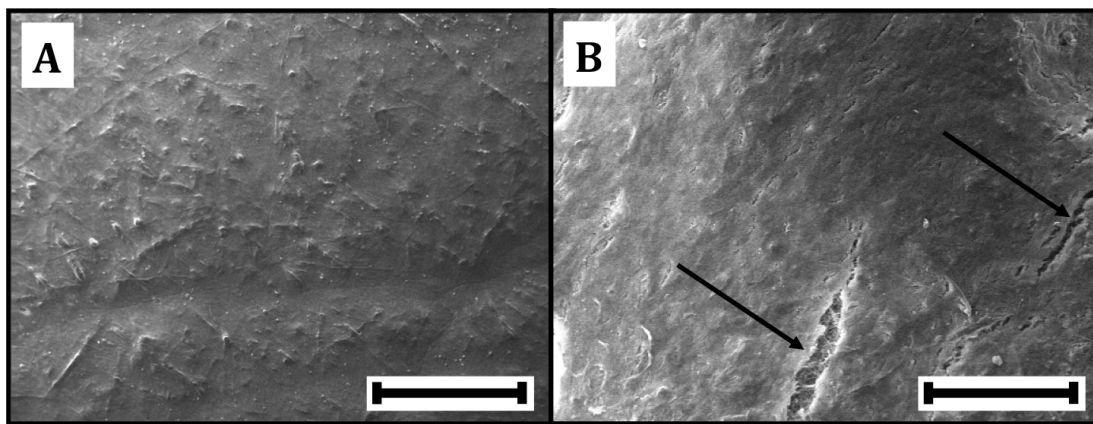


Abb. 7.3 PU Proben nach FB+EC Beschichtung und Konditionierung für 5 Tage Nach Besiedlung mit FB + EC wird eine konfluente und homogene Zellschicht sichtbar **(A)**. Nach der Konditionierung liegen kopfsteinpflasterartige EC sowie faserartige FB vor **(B)**. Vereinzelt sind Risse erkennbar **(B; schwarze Pfeile)**. Maßstab = 500µm

7.2.3. TAVI-Prozedur und Perfusion

Nach der TAVI-Simulation wurden vielfach geschädigte Stellen in den REM-Aufnahmen entdeckt (Abb. 7.4A-B). Sie zeigen Fissuren in paralleler Anordnung in keinem bestimmten Abstand. Sie unterscheiden sich deutlich von

Trocknungsartefakten (Abb. 7.3B). Daneben sind die konfluenten Zellschichten, mit Pflastersteinrelief nach wie vor zu erkennen.

Der re-Perfusionsschritt trägt zu einer Vergrößerung der Risse und einer insgesamt Verschlechterung der Zellbeschichtung bei. Nach Perfusion tritt der faserige PU-Patch wieder deutlich hervor (Abb. 7.4C). Daneben ist die faserartige FB-Morphologie teilweise gut sichtbar.

In den Segeln ist nach der TAVI-Simulation und Perfusion eine glatte und größtenteils konfluente Zellschicht erkennbar. Ebenfalls werden Fissuren und Spalten sichtbar. Sie verlaufen parallel. Auch der Abstand ist unbestimmt (Abb. 7.4D). Auf den Segeln treten im Vergleich zu den Prothesenwänden keine Löcher auf.

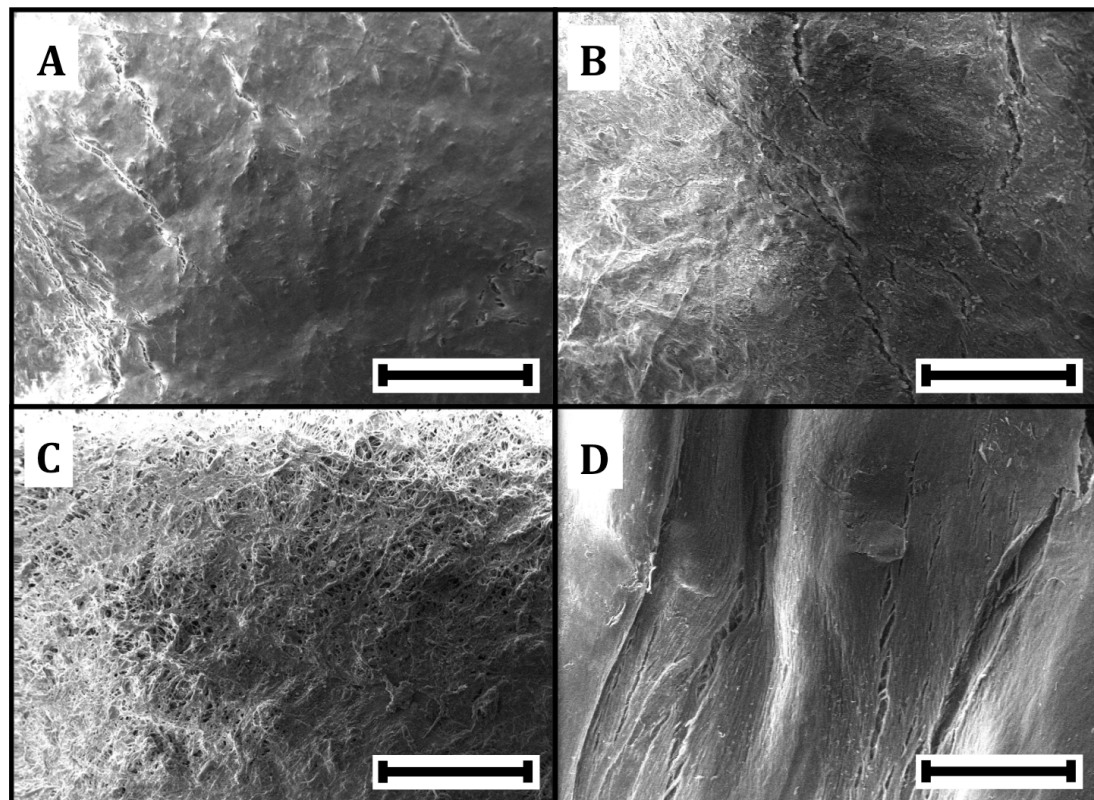


Abb. 7.4: Gecrimpte und perfundierte SBAP Es sind nach TAVI-Simulation in den PU-Proben parallel verlaufende Fissuren erkennbar (A-B). Nach der Perfusion lassen sich Löcher und PU-Fasern nachweisen (C). In den Homograft-Segeln sind Risse zu erkennen, die vom Crimping resultieren (D). Maßstab = 500µm

7.3. Immunhistochemie

7.3.1. Zellkultur

Vor jedem Beschichtungsvorgang sollten die FB und EC immunzytochemisch nachgewiesen werden. Als Hilfsmittel wurden verschiedene AK eingesetzt (Kap. 6.3.2). TE-7 (Abb. 7.5F) und Fibronectin (Abb. 7.5D) wurden verwendet, um die FB darzustellen. Negative Reaktionen zeigten sich bei den Färbungen gegen α -Actin (Abb. 7.5A), CD-31 (Abb. 7.5B), Collagen-IV (Abb. 7.5C) und SMC-Myosin (Abb. 7.5E). Bei Zellen, die negativ reagierten, zeigte sich durch die Hemalaunfärbung nur der Zellkern lila.

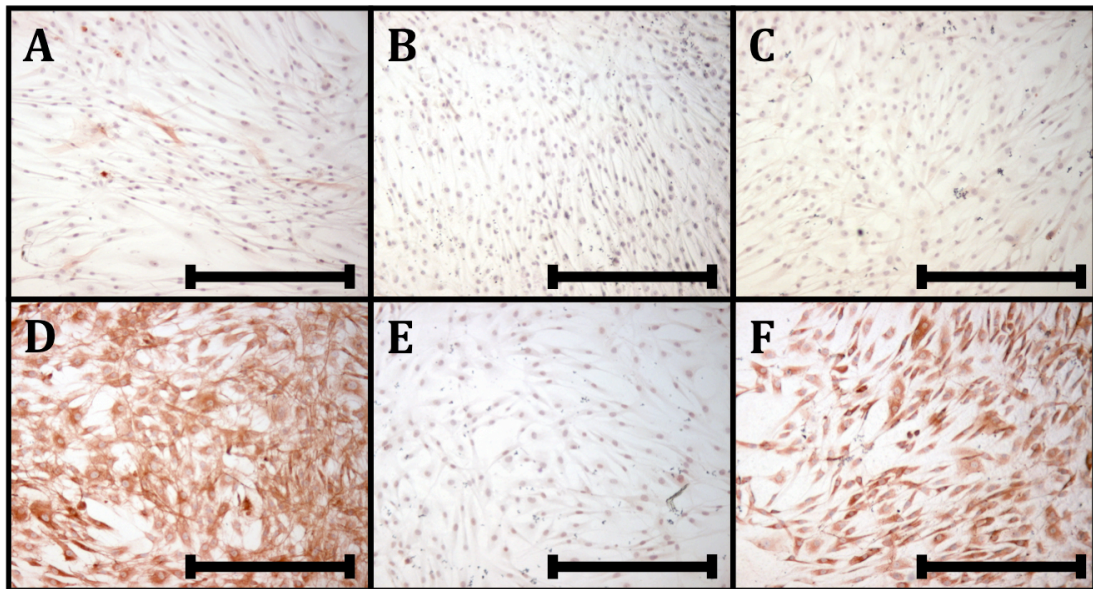


Abb. 7.5: Immunzytochemische Färbung der FB Negative Reaktionen gegen α -Actin (A), CD-31 (B) und Collagen-IV (C) sowie SMC-Myosin (E). Gegen Fibronectin (D) und TE-7 (F) gefärbte FB sind positiv und stellen sich braun dar. Maßstab = 100 μ m

Bei den EC ist eine positive Reaktion nur mit CD-31 (Abb. 7.6A) und VE-Cadherin (Abb. 7.6B) feststellbar. Es gibt keine Reaktionen auf Connexin-43 (Abb. 7.6C) und TE-7 (Abb. 7.6D).

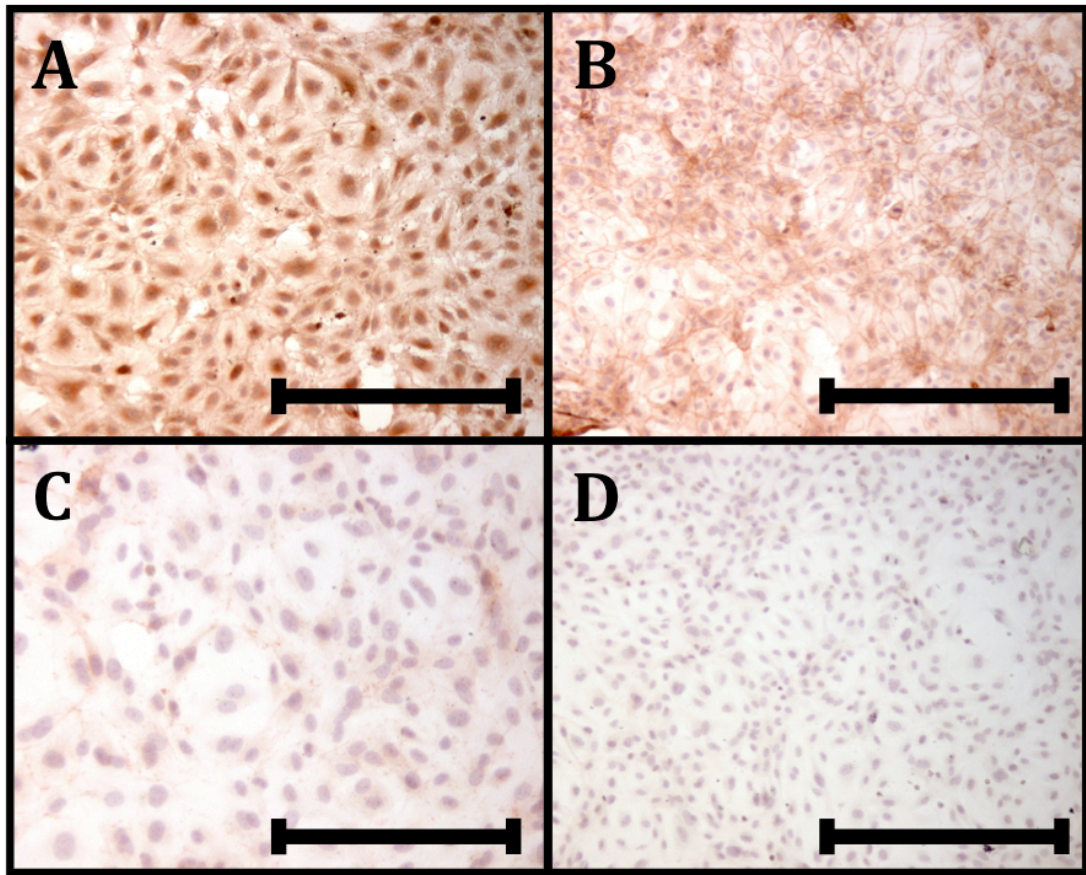


Abb. 7.6: Immunzytochemische Färbung der EC Positive Reaktion (braun bzw. hellbraun) mit CD-31 **(A)** und VE-Cadherin **(B)**. Negative Reaktionen bei Connexin-43 **(C)** und TE-7 **(D)**. Maßstab = 100µm

7.2.2. Nachweis der Zellbeschichtung

Der Erfolg der FB-Beschichtung kann durch die immunhistochemische Färbung gegen TE-7 nachgewiesen werden. An der Probenoberfläche ist ein dünnes rotbraunes Band erkennbar und beweist die Anwesenheit von FB. Es kommen keine Unterbrechungen vor (Abb. 7.7A). Die fünftägige Konditionierung trägt zu einer starken Vermehrung der FB und damit zu einer Verdickung der FB-Schicht bei (Abb. 7.7B). Nach der TAVI-Prozedur (Abb. 7.7C) sind deutlich weniger FB in einer weniger stark ausgeprägten Zellschicht erkennbar. Die anschließende zweitägige re-Perfusion (Abb. 7.7D) führt zu einem fast vollständigen Verlust der Zellbeschichtung.

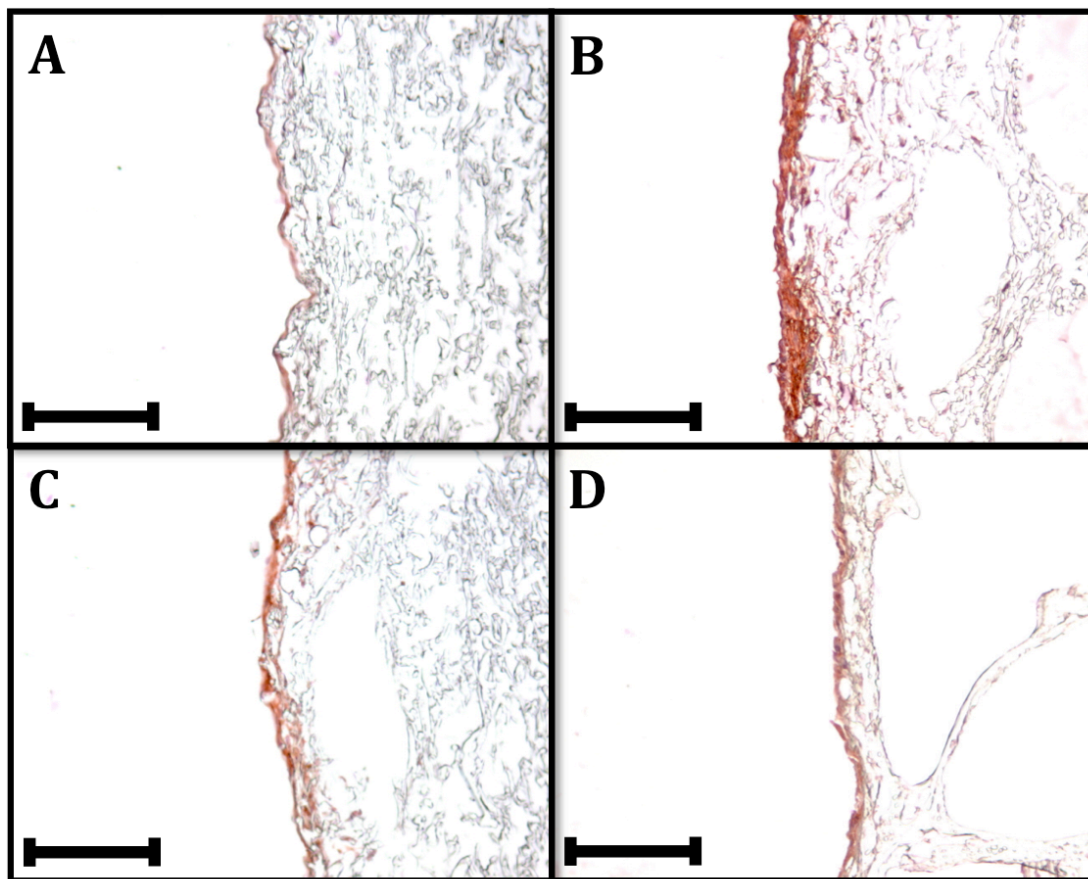


Abb. 7.7: Immunhistochemische Färbung gegen TE-7 nach Beschichtung mit FB + EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion Nach Beschichtung mit FB + EC lässt sich die reine FB-Schicht mittels immunhistologischer Färbung mit AK gegen TE-7 nachweisen (**A**). Nach der Konditionierung treten deutlich verdickte und vermehrte FB auf (**B**). Nach TAVI-Simulation (**C**) und re-Perfusion (**D**) ist die FB-Schicht deutlich beschädigt und teilweise nicht mehr vorhanden. Maßstab = 200µm

Durch die Anfärbung mit CD-31 und VE-Cadherin lässt sich die erfolgreiche EC-Beschichtung nachweisen. Nach der Beschichtung mit FB + EC stellt die Färbung gegen CD-31 ein dünnes positives Band an der Probenoberfläche dar (Abb. 7.8A). Die immunhistochemische Reaktion gegen CD-31 (Abb. 7.8B-C) nimmt nach Konditionierung zunächst zu und wird nach der TAVI-Simulation wieder geringer. Nach re-Perfusion ist fast keine positive Färbung mehr sichtbar und es lassen sich kaum noch EC nachweisen (Abb. 7.8D).

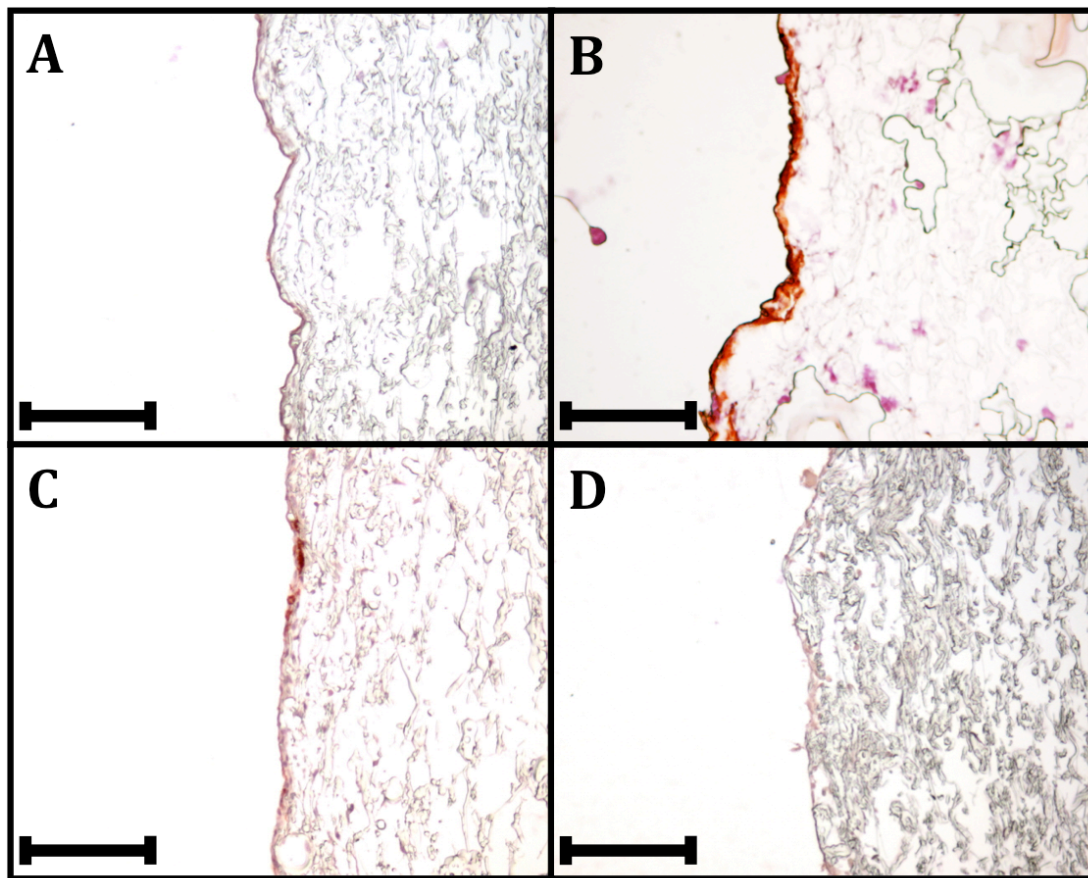


Abb. 7.8: Immunhistochemische Färbung gegen CD-31 nach Beschichtung mit FB + EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion Nach Beschichtung mit FB + EC ist eine kontinuierliche positive Färbung gegen CD-31 an der Probenoberfläche sichtbar (**A**). Nach Konditionierung nimmt diese deutlich zu (**B**). Eine leichte Abnahme der Färbung ist nach der TAVI-Simulation erkennbar (**C**). Nach der Perfusion nimmt die Färbung stark ab und es ist keine kontinuierliche Zellschicht mehr zu erkennen (**D**). Maßstab = 200µm.

Nach FB + EC Beschichtung zeigt sich eine moderate positive Reaktion an der Probenoberfläche bei der immunhistochemischen Färbung gegen VE-Cadherin

(Abb. 7.8A). Nach allen weiteren Prozessschritten sind die immunhistochemischen Färbungen gegen VE-Cadherin vergleichbar stark ausgeprägt (Abb. 7.9B-D).

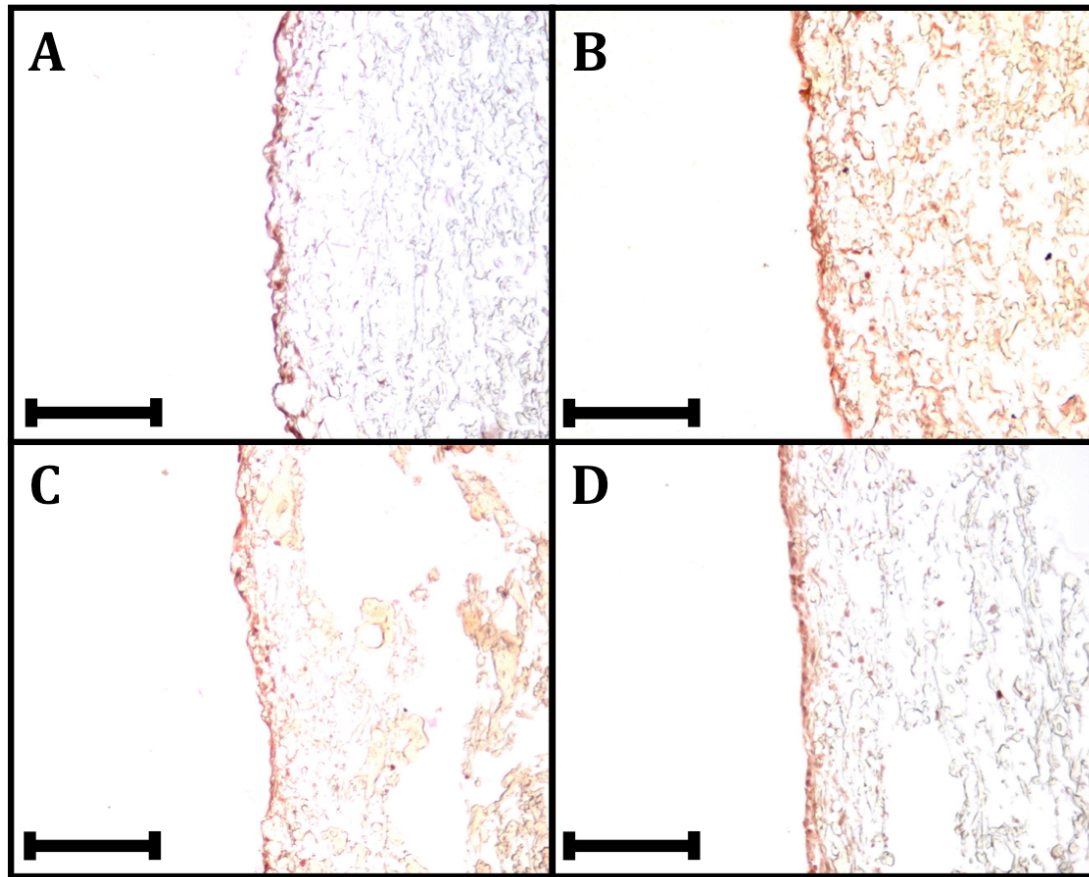


Abb. 7.9: Immunhistochemische Färbung gegen VE-Cadherin nach Beschichtung mit FB + EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion Nach allen Prozessschritten ist die Färbungsintensität nahezu identisch (A - D). Maßstab = 200 μ m.

6.2.3. Nachweis der extrazellulären Matrix

Mittels AK gegen Collagen-IV und Fibronectin lässt sich die extrazelluläre Matrix (EZM) nachweisen. Nach Zellbeschichtung zeigt sich eine schwache kontinuierliche Anfärbung an der Probenoberfläche (Abb. 7.10A). Die Konditionierung verstärkt diese Farbreaktion deutlich (Abb. 7.10B). Nach der TAVI-Simulation zeigt sich die EZM anhand der Färbung leicht geschwächt (Abb.7.10C). Die Intensität ist nach zweitägiger re-Perfusion unverändert (Abb.7.10D).

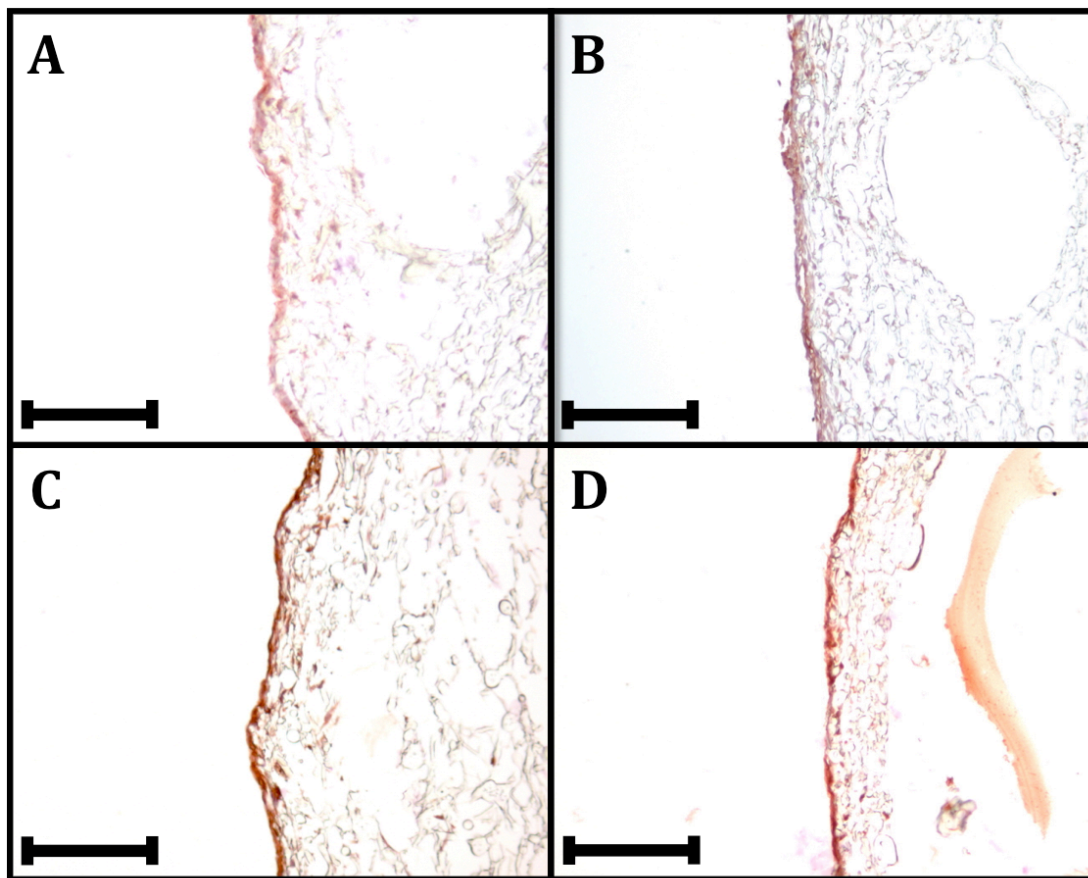


Abb. 7.10: Immunhistochemische Färbung gegen Collagen IV nach Beschichtung mit FB + EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion Der Aufbau einer EZM lässt sich nach Beschichtung mit FB + EC mittels positiver Färbung gegen Collagen IV lückenlos nachweisen **(A)**. Bei den konditionierten Proben ist eine stärker eingefärbte und dickere Schicht erkennbar **(B)**. Nach TAVI-Simulation **(C)** und re-Perfusion **(D)** zeigt sich die Anfärbung schwächer. Außerdem sind nach re-Perfusion Lücken in der Beschichtung zu erkennen. Maßstab = 200µm.

Eine sehr schwache Expression von Fibronectin wird nach Zellbesiedlung mit FB + EC mittels IHC-Färbung erkennbar (Abb. 7.11A). Nach der Flusskonditionierung ist eine deutlich stärkere Intensität feststellbar (Abb. 7.11B). Sie nimmt nach der TAVI-Simulation und der re-Perfusion wieder ab (Abb. 7.11C-D).

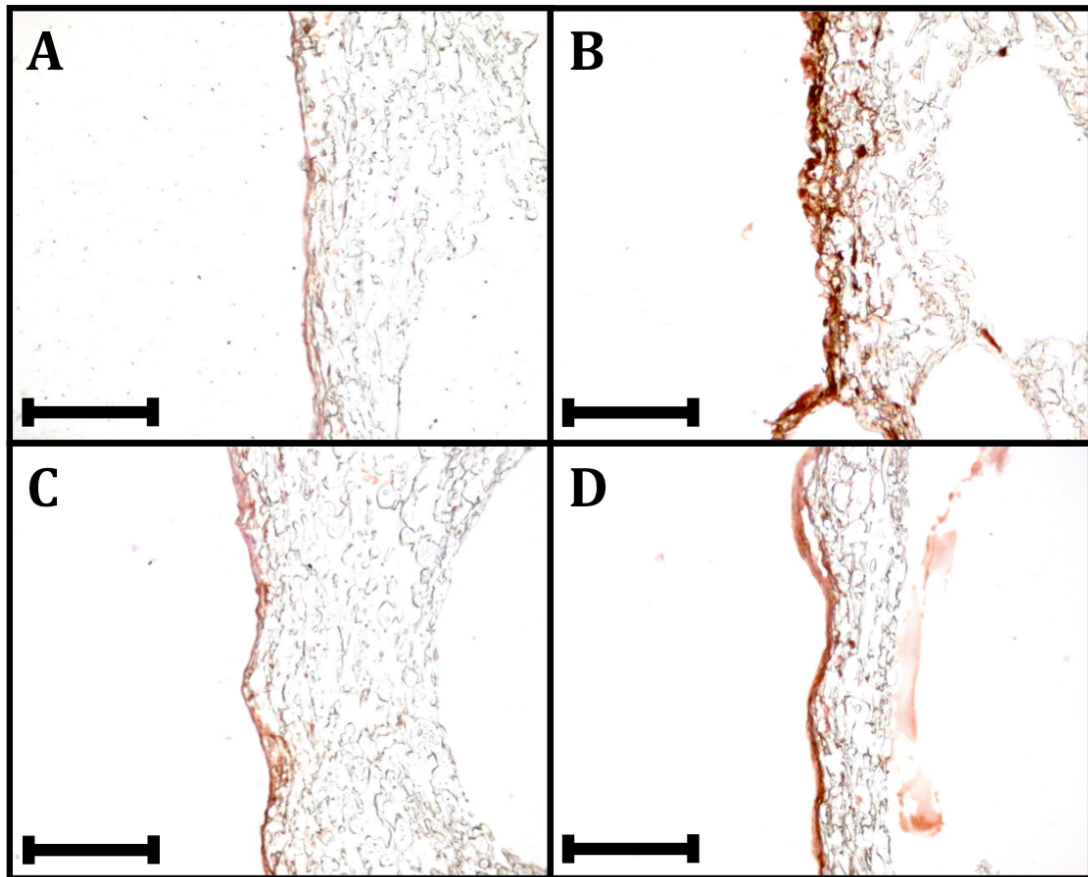


Abb. 7.11: Immunhistochemische Färbung gegen Fibronectin nach Beschichtung mit FB + EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion Der Aufbau der EZM mittels Fibronectin **(A)** ist nach Beschichtung mit FB + EC lückenlos nachzuweisen. Bei den konditionierten Proben ist eine deutlich prominentere EZM vorhanden, was sich an der stärkeren Färbung erkennen lässt **(B)**. Die Reaktion gegen Fibronectin lässt nach Crimping **(C)** und Perfusion **(D)** nach. Maßstab = 200µm.

7.2.4. Zytoskelett und Interzelluläre Verbindung

Nach der Beschichtung mit FB + EC lassen sich immunhistochemische Anfärbungen gegen α -Actin (Abb. 7.12A) und Connexin-43 (Abb. 7.13A) nachweisen. Es zeigt sich ein Band, das rotbraun eingefärbt ist. Dieses bedeckt die Probenoberfläche lückenlos. Durch den niedrigen Fluss während der Konditionierung können die interzellulären Bindungen und das Zytoskelett gefördert werden (Abb. 7.12B und Abb. 7.13B). Eine reduzierte Farbreaktion im Fall von Connexin-43 (Abb. 7.13C-D) ist nach der TAVI-Simulation und der re-Perfusion festzustellen. Bei α -Actin sind die Anfärbungen jedoch unverändert (Abb. 7.12C-D).

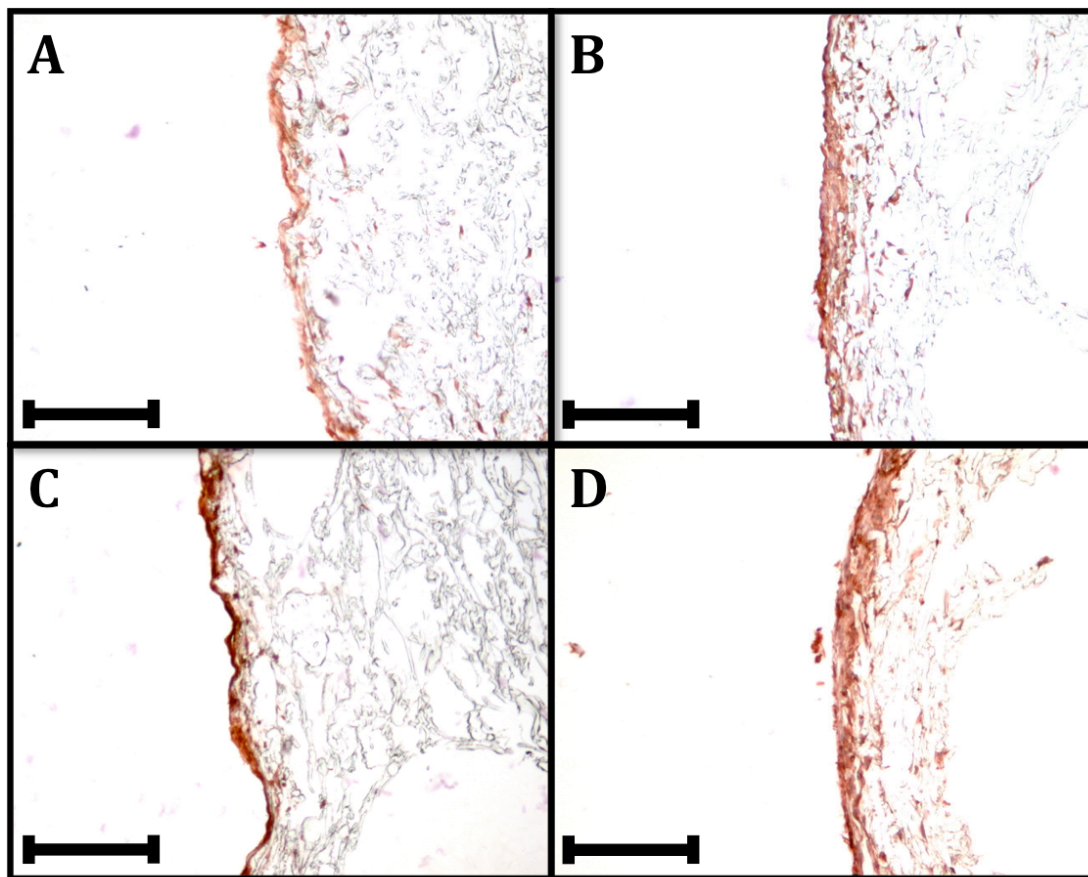


Abb. 7.12: Immunhistochemische Färbung gegen α -Actin nach Beschichtung mit FB + EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion Eine ausgeprägte Farbreaktion nach Besiedlung mit FB + EC wird bei α -Actin ausgelöst (**A**). Nach der Konditionierung zeigt sich eine Stärkung des Zytoskeletts bei allen Proben (**B**). Crimping (**C**) und Perfusion (**D**) führen zu einer gleichbleibenden Farbreaktion. Maßstab = 200 μ m.

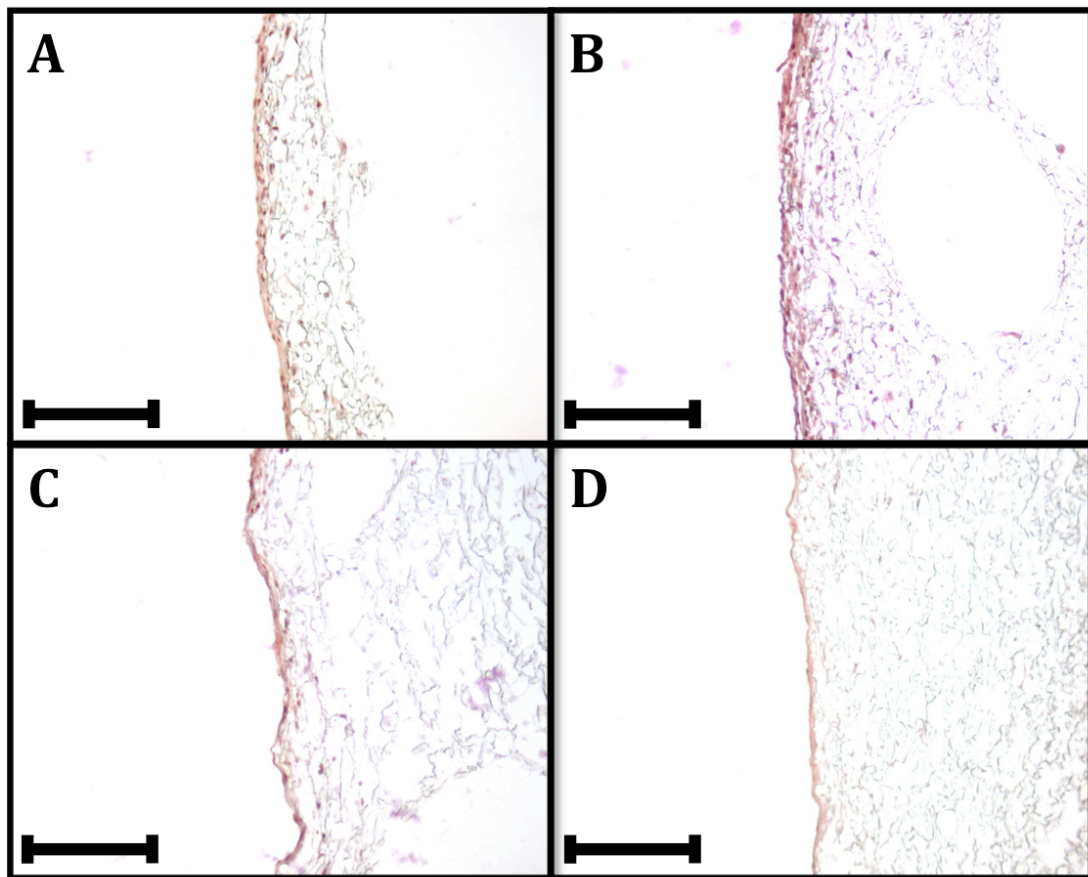


Abb. 7.13: Immunhistochemische Färbung gegen Connexin-43 nach Beschichtung mit FB + EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion Eine ausgeprägte Farbreaktion gegen Connexin-43 zeigt sich nach Besiedlung mit FB + EC (**A**). Nach der Konditionierung werden vermehrt interzelluläre Bindungen bei allen Proben aufgebaut (**B**). Bei Connexin-43 tritt eine deutlich reduzierte Farbreaktion nach der TAVI-Simulation (**C**) und der re-Perfusion (**D**) auf. Maßstab = 200µm.

7.2.5. Immunmodulatorische Reaktion

Nach der Beschichtung mit FB + EC zeigt sich eine schwach positive Reaktion bei der Färbung gegen ICAM (Abb. 7.14A). Am Ende der Konditionierung liegt eine extrem dünne, bandförmige und schwach gefärbte Schicht vor (Abb. 7.14B). Die TAVI-Simulation verstärkt die Farbreaktion deutlich (Abb. 7.14C) Sie vermehrt sich außerdem nach der re-Perfusion deutlich (Abb. 7.14D).

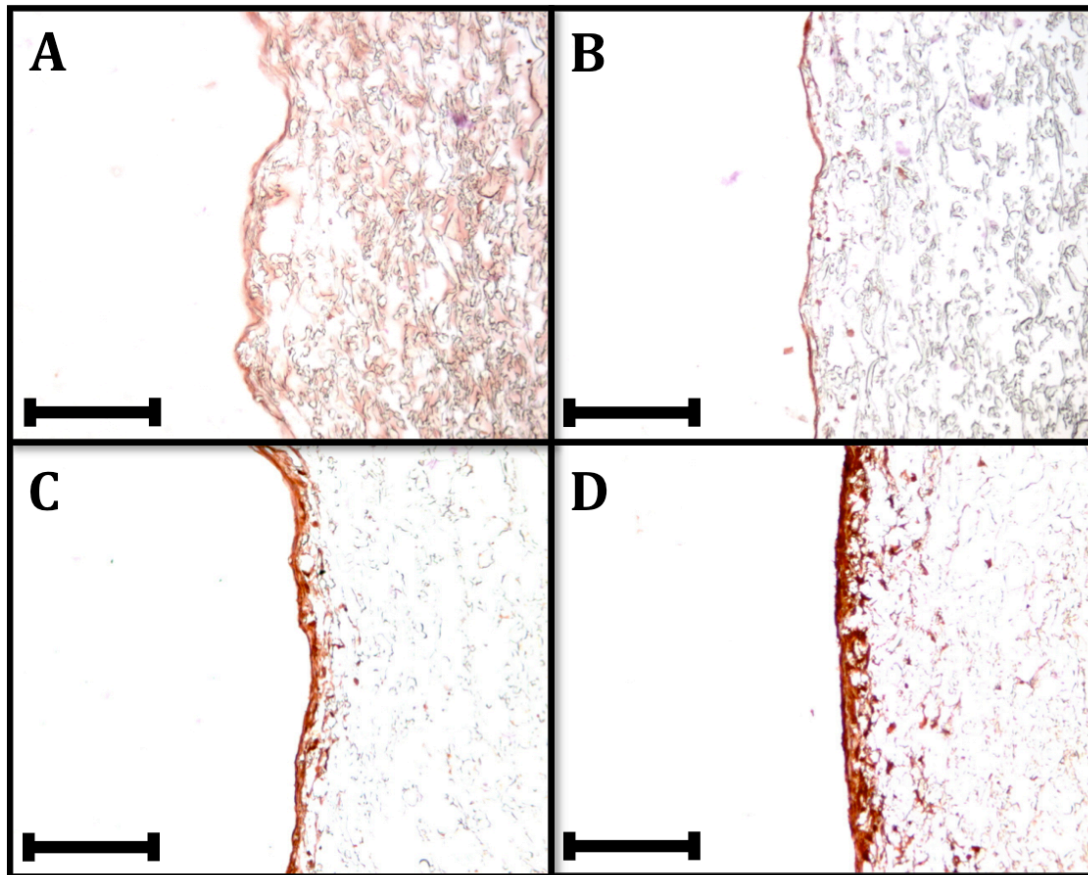


Abb. 7.14: Immunhistochemische Färbung gegen ICAM nach Beschichtung mit FB + EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion Eine dünne, schwach positiv gefärbte Schicht ist nach der Beschichtung mit FB + EC und der Konditionierung erkennbar. Sie zeigt eine positive Reaktion gegen ICAM (A-B). Diese Reaktion nimmt nach der TAVI-Simulation und der re-Perfusion sehr stark zu (C-D). Maßstab = 200µm.

7.2.6. Überblick der tabellarischen Zusammenfassung

	Zellkultur			Nach Perfusion			
	FB	EC	Nach FB- +EC- Beschichtung	Nach Konditionierung	Nach TAVI- Prozedur	Wand	Segel
TE-7	+++	-	+	+++	++	++	++
CD-31	-	+++	+	++	++	-	-
VE-Cadherin	N.D.	++	++	++	++	++	++
Collagen IV	-	N.D.	++	+++	++	++	++
Fibronectin	+++	N.D.	+	+++	++	++	++
Connexin-43	N.D.	-	++	+++	+	+	+
a-Actin	-	N.D.	++	+++	+++	+++	+++
SMC-Myosin	-	N.D.	+	+	+	+	++
ICAM	N.D.	N.D.	+	+	++	+++	+++

Tabelle 7.1: Zusammengefasste Ergebnisse (-) keine Anfärbung vorhanden, (+) leichte Anfärbung, (++) mittelgradige Anfärbung, (+++) starke Anfärbung; N.D. = nicht durchgeführt (Quelle: Originalartikel)

7.4. Zellvitalität

Die vitalen Zellen sind vor dem Crimping grün gefärbt (Abb. 7.16A). Es gibt nur wenige rote Zellen. Die toten Zellen vermehren sich nach der TAVI-Prozedur und machen etwa 50% aus (Abb. 7.16B). Die Proben zeigen nach re-Perfusion wieder deutlich weniger tote Zellen, wirken aber pathologisch (Abb. 7.16C). Es sind nur wenige abgestorbene Zellen nachweisbar.

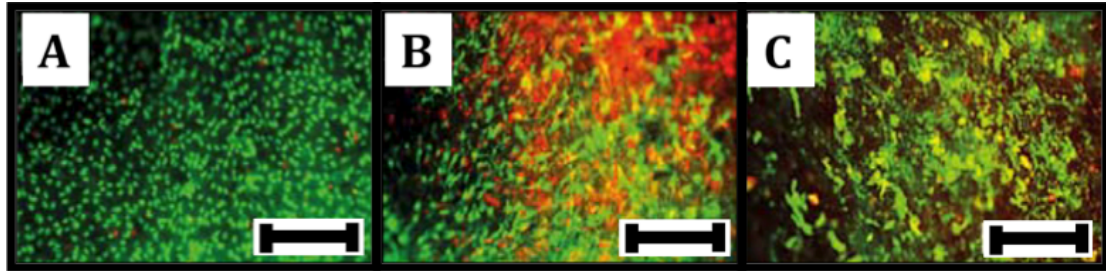


Abb. 7.15: Live/Dead Färbung vor und nach Crimping sowie re-Perfusion Es gibt vor dem Crimping fast ausschließlich vitale Zellen (grün) und nur wenige tote Zellen (rot) **(A)**. Nach dem Crimping ist die Hälfte der Zellen tot **(B)**. Nach re-Perfusion reduziert sich der Anteil der toten Zellen wieder deutlich **(C)**. Die vitalen Zellen erscheinen pathologisch. Maßstab = 100µm.

8. Diskussion

Die Inzidenz von AS nimmt aufgrund einer alternden Bevölkerung zu [104]. Die TAVI-Prozedur ist eine neuartige Therapiemöglichkeit und wird inzwischen weltweit durchgeführt. Der Einsatz dieser Methode steigt aktuell exponentiell, auch in Deutschland. Hier ist die Zahl in 2008 von 637 auf 13,264 im Jahr 2014 angestiegen. Gleichzeitig hat sich die Anzahl der sAVR von 11.205 auf 9.953 verringert [105]. Die derzeit bei TAVI verwendeten biologischen Herzklappenprothesen haben dennoch einige Nachteile wie ihre progrediente Verkalkung und damit unberechenbare Haltbarkeit. Daneben ist die begrenzte Fähigkeit zur Selbstreparatur sowie Umformung zu nennen. Der manuelle Herstellungsprozess und das Crimp-Verfahren sind für die fortschreitende Verkalkung mitverantwortlich [10].

TAVI ist ein minimal-invasives Verfahren. Es kam ursprünglich vor allem bei inoperablen Patienten über 75 Jahre zum Einsatz. Die Langzeitprobleme hatten daher keine hohe Priorität. Mittlerweile haben sich die Indikationsbereiche für TAVI zunehmend erweitert. Die Methode wird inzwischen auch bei jüngeren Patienten oder Patienten mit geringerem OP-Risiko angewendet. Dadurch rückten auch die Nachteile mehr in den Fokus der Betrachtung.

Das Tissue-Engineering, was bei Herzklappenprothesen (TEHV) zur Anwendung kommt, birgt großes Potential und stellt eine mögliche Lösung dieser Probleme dar. Ziel der hier durchgeführten Studie war es, eine ideale Herzklappenprothese zu entwickeln und eine TAVI zu simulieren. Hierbei wurden zwei verschiedene Materialien verwendet: gesprühtes PU und dezellularisierte Homografts. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer physikalischen, biologischen und mechanischen Eigenschaften. Sie wurden kombiniert, um Mängel der einzelnen Materialien auszugleichen. Die dezellularisierten Homografts haben sich als effektive Zellträger für die Zellbesiedlung herauskristallisiert. Sie verfügen über eine gute Haltbarkeit. Im Gegensatz zu xenogenen Materialien treten immunogene Reaktionen nicht so oft auf [106, 107]. Bevor Xenografts eingesetzt werden, müssen sie dezellularisiert oder fixiert werden. Dies ist zum Beispiel mit Glutaraldehydlösung möglich [108]. Bei der Anwendung der Xenografts können

jedoch Entzündungs- und Degenerationsreaktionen trotzdem nicht ganz ausgeschlossen werden [109]. Aus diesem Grund entschieden wir uns für Homografts als Hauptmaterial der neu entwickelten BAV. Die große Gewebemenge in der Wand (hohe Wandstärke) des Homografts eignet sich jedoch nicht für den Einsatz im Stent. Ebenfalls ist sie für das danach folgende Crimp-Verfahren ungeeignet. Aus diesem Grund wurden lediglich die Segel der Homografts genutzt. Als Wand nutzten wir PU, welches eine hohe Biokompatibilität aufweist. Studien zeigen, dass PU ein guter Zellträger ist [110]. PU zeichnen sich außerdem durch gute biomechanische Eigenschaften aus. Die Struktur wird bei systolischem Druck und Shear-Stress beibehalten [111, 112]. Damit reicht eine dünne Wandstärke, denn die notwendige Stabilität bleibt unter physiologischem Druck bestehen. Bereits in früheren Forschungen wurde die Fähigkeit von tissue engineerter Homografts und PU-Prothesen als Zellträger nachgewiesen [113]. Neuschwander et al. kamen zu denselben Schlussfolgerungen [114]. Innerhalb dieser Studie zeigte sich ebenfalls, dass die BAV für die Zellbesiedlung gut geeignet sind.

Mithilfe der endoskopischen Aufnahmen konnte die Funktionalität der BAV gut beobachtet werden, sowohl während der niedrigen (500ml/min) als auch während der hohen pulsatilen Strömung (1100ml/min). Während der Konditionierung zeigte sich ein insuffizientes Schließverhalten. Das Schließen sowie Öffnen während der Perfusion war dagegen ordnungsgemäß. Es gab keine Hinweise auf eine Insuffizienz. Das Öffnungsverhältnis, das maximal möglich ist, wurde berechnet und lag bei 49%. Unter Berücksichtigung des menschlichen Herzminutenvolumens (4.5 bis 5 l/min) ist bei maximaler Systole eine entsprechende Vergrößerung möglich.

Eine ideale Prothese zeichnet sich durch eine sehr geringe oder abwesende inflammatorische und, thrombogene Reaktion sowie Infektionsresistenz aus. Um dies zu erreichen erfolgte die Beschichtung der BAV mit zwei unterschiedlichen menschlichen Gefäßzellen: FB und EC. Es konnte in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden, dass sich EC eher an FB vorbesiedelten Zellträger anhaften können [115]. Dies konnten wir in der vorliegenden Studie bestätigen. Allerdings macht dieser Ansatz eine serielle Zellbeschichtung notwendig. Zugleich weisen

die Zellschichten der TEHV so eine erwünschte Ähnlichkeit zu menschlichen Herzklappen auf [77].

Laut Butscher et al. sind Zellen, die aus dem valvulären Bereich stammen, eine geeignete Quelle für das Herzklappen-Tissue Engineering [116]. Autologe Zellen sind aufgrund der fehlenden Immunkompatibilität für das beschriebene Verfahren eher unpraktisch. Schnell et al. sehen dagegen venöse FB und EC für das kardiovaskuläre Tissue Engineering als geeignet [117]. Nach der Zellbeschichtung können sie interzelluläre Verbindungen und EZM aufbauen. Aufgrund ihrer hohen Verfügbarkeit, sind sie gut im Tissue Engineering anwendbar. Die Applikation solcher venösen Zellquellen kann damit als eine gute Möglichkeit angesehen werden, BAV herzustellen [117]. In der hier beschriebenen Studie bestätigte sich dies.

Eine EZM lässt sich im kardiovaskulären Tissue Engineering nach Sierad et al. am Besten unter physiologischen pulsatilen Flussbedingungen formen. Ebenso können hierunter auch interzelluläre Verbindungen aufgebaut werden [118]. In der vorliegenden Studie wurde ein Bioreaktor eingesetzt, um BAV für einen Zeitraum von fünf Tagen zu konditionieren. Dies erfolgte bei niedrigem pulsierendem Fluss (500ml/min). Während dieser Phase konnte der Aufbau einer EZM mittels IHC-Analyse nachgewiesen werden. Dazu wurde AK gegen Kollagen IV und Fibronectin verwendet (Abb. 7.10-11; Tab. 7.1). Des Weiteren konnte ein intakter Zellverband nach Zellbesiedelung und Konditionierung auf dem Zellträger nachgewiesen werden. Dies wurde anhand des Zytoskeletts und interzellulärer Moleküle bewiesen, welche sich durch die IHC darstellten. Als Epitope wurden α -Actin und Connexin-43 gewählt. Die Integrität der Zellschicht wurde ebenfalls mithilfe des REM nachgewiesen (Abb. 7.3).

Beim Crimping erfolgt die Kompression von TAVR. Hierdurch soll ein kleinerer Außendurchmesser erzeugt werden. Dieser Schritt ist in der TAVI notwendig um die Prothese möglichst schonend in den Körper einzubringen. Die Prozedur wird unabhängig vom Stentmaterial durchgeführt [119]. Unsere BAV wurden mit einem Durchmesser von 20mm hergestellt und liegen damit im unteren Durchschnitt der Durchmesser aktuell verfügbarer und kommerzieller Prothesen. Zudem sollen sie auch bei jungen Patienten eingesetzt werden können [120, 121]. Kommerzielle TAVR werden üblicherweise auf 6 bzw. 8mm

komprimiert. Die BAV wurde jedoch nur auf einen Durchmesser von 10 mm gecrimpt. Hierdurch sollte die Integrität der Prothese und ihrer Zellbeschichtung unter niedriger Belastung sichergestellt werden [122]. Nach der TAVI-Simulation waren in der IHC und im REM leicht beschädigte, jedoch weitgehend konfluente Zellschichten zu erkennen.

Außerdem war es möglich, Proben, die gegen ICAM angefärbt wurden, hinsichtlich ihrer interzellulären Immunreaktionen zu bewerten. Laut Studie von Yang et al. ist die erhöhte ICAM-Expression eine Ursache für transendotheliale Migration von Leukozyten. ICAM kann also als Indikator für Immunreaktionen, Verletzungen oder Entzündungen gesehen werden [123]. Nach der Zellbeschichtung sowie Konditionierung konnte keine signifikante Expression von ICAM ermittelt werden. Nach der TAVI-Simulation ist jedoch ein starker Anstieg erkennbar (Tab. 7.1). Die starke Anfärbung gegen ICAM ist auf eine starke inflammatorische Reaktion zurückzuführen (Abb. 7.14), was mithilfe der Fluoreszenz-Analyse bestätigt werden kann. Die Live-/Dead-Färbung zeigt einen hohen Prozentsatz an toten Zellen, welche nach dem Crimpen vorlagen. Deren Nachweis ist auch durch IHC und REM möglich. Allerdings lässt die IHC-Färbung gegen CD-31 und TE-7 keinen Rückschluss auf die Vitalität von FB und EC zu.

Die immunhistochemische Analyse nach der Perfusion deckt hingegen fragmentierte und zerstörte Zellschichten auf. Es zeigt sich eine starke Reduzierung der Zellbeschichtung mit Einrissen. Bei den REM-Aufnahmen sind ähnliche Ergebnisse erkennbar. Hier liegen auch Lücken und eingerissene Stellen in den Zellschichten vor. Nach der Perfusion sind in der Live-/Dead-Analyse wenige tote Zellen erkennbar. Der Großteil der Zellen ist vital. Entsprechend ihrer Morphologie werden hier vor allem FB angedeutet. Das lässt sich durch positive Färbungen gegen TE-7 (Abb. 7.7) belegen. Es ist anzunehmen, dass die EC-Beschichtung weitgehend zerstört wurde. Es ist allerdings ebenso möglich, dass ihre mechanische Integrität nach der TAVI-Simulation nicht mehr gegeben war. Die anschließenden physiologischen Strömungsbedingungen haben die beschädigten Zellen schließlich abgelöst und weggespült.

Diese Schädigungen durch das Crimping sind mit der IHC nicht sofort zu erkennen (Abb. 7.14C). Die starke ICAM-Expression kann dennoch ein Hinweis auf induzierten Stress sein (Abb. 7.14D). Um induzierte Schäden, die durch

Crimping entstehen, richtig zu bewerten, müssen weitere Methoden zur Anwendung kommen. Dies kann zum Beispiel die Live-/Dead-Färbung sein. Längerfristige Untersuchungen sollten ebenso durchgeführt werden.

In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der minimalinvasiven Anwendung von tissue engineerter Herzklappen bewertet werden. In früheren Studien finden sich bereits Untersuchungen zu PU-Herzklappenprothesen sowie Homografts, wobei beide Lösungen individuelle Vor- und Nachteile haben. PU-Herzklappenprothesen lassen sich sehr gut crimpen. Die Integrität der Segel stellt sich jedoch als problematisch dar. Bei den Homografts sind die Segel ausgezeichnet. Sie sind jedoch ungeeignet zum Crimpen, was auf ihre Struktur und die Wanddicke zurückzuführen ist. In dieser Studie wurden diese Materialien kombiniert. Ziel war es, eine ideale Prothese herzustellen, die für die minimalinvasive Implantation geeignet ist. Bezüglich der Beschichtung der Herzklappenprothesen konnten hervorragende Ergebnisse erzielt werden. Dies trifft auch auf die EZM-Expression zu. Die Exposition gegenüber pulsatilem Strömungsbedingungen trug dazu bei, das EZM und interzelluläre Verbindungen aufgebaut wurden. Beim Crimpen entstanden jedoch Schäden, vor allem in den endothelialen Zellschichten. Diese sind sehr schwerwiegend und führten zur fast vollständigen Zerstörung der EC-Schicht. Das Crimpen hat somit langfristige negative Auswirkungen. Daher sollte dessen Einsatz bei lebenden tissue engineerter Prothesen überdacht werden.

9. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit ließ sich eine neue Art der gestenteten Aortenklappenprothese herstellen. Diese besteht aus einem Polyurethanpatch und dezellularisierten Homograftsegeln. In der endoskopischen Betrachtung zeigte sich im Vergleich zum gesunden Mensch sowohl eine ausreichende Klappenöffnungsfläche als auch eine suffiziente Schließfunktion unter niedrigerer Flussrate im Bioreaktor. Es besteht die Möglichkeit, dass höhere Strömungsgeschwindigkeiten zu einer Vergrößerung der Klappenöffnungsfläche beitragen. Beim physiologischen systolischen Druck müssten allerdings deutlichere höher aufgelöste und kontrastreichere Bilder erzeugt werden, was für eine weitere Analyse notwendig ist.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass sich die beiden Materialien hervorragend eignen, um von Zellen beschichtet zu werden. In der immunhistochemischen Färbung zeigten sich Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM) und interzelluläre Verbindungen, welche sich nach der dynamischen Konditionierung vermehrt zeigten. Die Existenz einer konfluenten Zellbeschichtung konnte durch die Untersuchung mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) bestätigt werden.

Nach dem Crimpen waren in der REM-Aufnahme zahlreiche beschädigte Stellen erkennbar. Eine große Anzahl toter Zellen war in der Live-/Dead Färbung nachweisbar. Nach der re-Perfusion fanden sich vermehrte inflammatorische Reaktionen, welche mittels IHC gegen ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) bewiesen wurden. Die IHC-Färbung gegen CD-31 (Cluster Designation-31) ist im Vergleich zu anderen Antikörpern außer ICAM deutlich reduziert geworden. Zwar zeigten sich in der Live-/Dead-Färbung nach der re-Perfusion kaum tote Zellen, aber die Mehrheit der lebendigen Zellen ähnelten morphologisch Fibroblasten. Insgesamt können wir davon ausgehen, dass die durch das Crimpen gestorbenen Zellen auf der Zellschicht während der re-Perfusion abgelöst und ausgeschwemmt wurden.

Um die langfristigen Schäden durch das Crimpen bewerten zu können, ist eine weitere Auswertung nach der re-Perfusion notwendig. Sie müsste zudem einen längeren Zeitraum umfassen.

10. Literaturverzeichnis

1. Lindroos, M., et al., Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J Am Coll Cardiol*, 1993. **21**(5): p. 1220-5.
2. Iung, B. and A. Vahanian, Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol*, 2011. **8**(3): p. 162-72.
3. Stassano, P., et al., Aortic valve replacement: a prospective randomized evaluation of mechanical versus biological valves in patients ages 55 to 70 years. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(20): p. 1862-8.
4. Iung, B., et al., Decision-making in elderly patients with severe aortic stenosis: why are so many denied surgery? *Eur Heart J*, 2005. **26**(24): p. 2714-20.
5. Asimakopoulos, G., M.B. Edwards, and K.M. Taylor, Aortic valve replacement in patients 80 years of age and older: survival and cause of death based on 1100 cases: collective results from the UK Heart Valve Registry. *Circulation*, 1997. **96**(10): p. 3403-8.
6. Cribier, A., et al., Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation*, 2002. **106**(24): p. 3006-8.
7. Diez, J.G., Transcatheter aortic valve implantation (TAVI): the hype and the hope. *Tex Heart Inst J*, 2013. **40**(3): p. 298-301.
8. Rodes-Cabau, J., M. Urena, and L. Nombela-Franco, Indications for transcatheter aortic valve replacement based on the PARTNER trial. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2012. **65**(3): p. 208-14.
9. Dohmen, P.M., Tissue engineered aortic valve. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth*, 2012. **4**(2): p. 89-93.
10. Schoen, F.J., Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation*, 2008. **118**(18): p. 1864-80.
11. Kiefer, P., et al., Crimping may affect the durability of transcatheter valves: an experimental analysis. *Ann Thorac Surg*, 2011. **92**(1): p. 155-60.
12. Gurvitch, R., et al., Transcatheter aortic valve implantation: durability of clinical and hemodynamic outcomes beyond 3 years in a large patient cohort. *Circulation*, 2010. **122**(13): p. 1319-27.
13. Lynch, D.R., Jr., et al., Considerations in antithrombotic therapy among patients undergoing transcatheter aortic valve implantation. *J Thromb Thrombolysis*, 2013. **35**(4): p. 476-82.
14. Vesely, I., Heart valve tissue engineering. *Circ Res*, 2005. **97**(8): p. 743-55.
15. Mendelson, K. and F.J. Schoen, Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng*, 2006. **34**(12): p. 1799-819.
16. Schmidt, D. and S.P. Hoerstrup, Tissue engineered heart valves based on human cells. *Swiss Med Wkly*, 2006. **136**(39-40): p. 618-23.

17. König, F., et al., A Pulsatile Bioreactor for Conditioning of Tissue-Engineered Cardiovascular Constructs under Endoscopic Visualization. *J Funct Biomater*, 2012. **3**(3): p. 480-96.
18. Drenckhahn, D., *Anatomie: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*. 2008: Elsevier, Urban & Fischer.
19. Aumüller, G., et al., *Duale Reihe Anatomie*. 2014: Thieme Georg Verlag.
20. Gray, H., P.L. Williams, and L.H. Bannister, *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Medicine and Surgery*. 1995: Churchill Livingstone.
21. Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher, *Prometheus - Lernatlas der Anatomie: Innere Organe ; 118 Tabellen*. 2009: Thieme.
22. Paulsen, F. and J. Waschke, Sobotta, *Atlas der Anatomie des Menschen Band 2: Innere Organe*. 2011: Elsevier Health Sciences Germany.
23. Renz-Polster, H. and S. Aries, *Basislehrbuch innere Medizin: kompakt - greifbar - verständlich*. 2004: Elsevier, Urban und Fischer.
24. Schoen, F.J., Future directions in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology. *J Heart Valve Dis*, 1999. **8**(4): p. 350-8.
25. Aikawa, E., et al., Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. *Circulation*, 2006. **113**(10): p. 1344-52.
26. Rabkin-Aikawa, E., et al., Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J Heart Valve Dis*, 2004. **13**(5): p. 841-7.
27. Taylor, P.M., S.P. Allen, and M.H. Yacoub, Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. *J Heart Valve Dis*, 2000. **9**(1): p. 150-8.
28. Taylor, P.M., et al., The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(2): p. 113-8.
29. Carabello, B.A. and W.J. Paulus, Aortic stenosis. *Lancet*, 2009. **373**(9667): p. 956-66.
30. Rajamannan, N.M., et al., Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*, 2011. **124**(16): p. 1783-91.
31. Robicsek, F., M.J. Thubrikar, and A.A. Fokin, Cause of degenerative disease of the trileaflet aortic valve: review of subject and presentation of a new theory. *Ann Thorac Surg*, 2002. **73**(4): p. 1346-54.
32. Leopold, J.A., Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Circ Cardiovasc Interv*, 2012. **5**(4): p. 605-14.
33. Olszowska, M., Pathogenesis and pathophysiology of aortic valve stenosis in adults. *Pol Arch Med Wewn*, 2011. **121**(11): p. 409-13.
34. Manning, W.J., Asymptomatic aortic stenosis in the elderly: A clinical review. *JAMA*, 2013. **310**(14): p. 1490-1497.
35. Maganti, K., et al., Valvular heart disease: diagnosis and management. *Mayo Clin Proc*, 2010. **85**(5): p. 483-500.
36. Nishimura, R.A., et al., 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of

- Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014. **148**(1): p. e1-e132.
37. Shipton, B. and H. Wahba, Valvular heart disease: review and update. *Am Fam Physician*, 2001. **63**(11): p. 2201-8.
 38. Akhter, M.W. and S.H. Rahimtoola, [Update in the clinical management of valvular heart disease]. *Rev Esp Cardiol*, 2007. **60**(4): p. 333-41.
 39. Andersen, H.R., L.L. Knudsen, and J.M. Hasenkam, Transluminal implantation of artificial heart valves. Description of a new expandable aortic valve and initial results with implantation by catheter technique in closed chest pigs. *Eur Heart J*, 1992. **13**(5): p. 704-8.
 40. Webb, J.G., et al., Percutaneous aortic valve implantation retrograde from the femoral artery. *Circulation*, 2006. **113**(6): p. 842-50.
 41. Lichtenstein, S.V., et al., Transapical transcatheter aortic valve implantation in humans: initial clinical experience. *Circulation*, 2006. **114**(6): p. 591-6.
 42. Smith, C.R., et al., Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients. *N Engl J Med*, 2011. **364**(23): p. 2187-98.
 43. Webb, J. and A. Cribier, Percutaneous transarterial aortic valve implantation: what do we know? *Eur Heart J*, 2011. **32**(2): p. 140-7.
 44. Vahanian, A., et al., Transcatheter valve implantation for patients with aortic stenosis: a position statement from the European association of cardio-thoracic surgery (EACTS) and the European Society of Cardiology (ESC), in collaboration with the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *EuroIntervention*, 2008. **4**(2): p. 193-9.
 45. Smith, C.R., et al., Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients. *New England Journal of Medicine*, 2011. **364**(23): p. 2187-2198.
 46. Forrest, J.K., Transcatheter aortic valve replacement: design, clinical application, and future challenges. *Yale J Biol Med*, 2012. **85**(2): p. 239-47.
 47. Rodés-Cabau, J., et al., Antithrombotic Treatment in Transcatheter Aortic Valve Implantation Insights for Cerebrovascular and Bleeding Events. *Journal of the American College of Cardiology*, 2013. **62**(25): p. 2349-2359.
 48. Laborde, J.C., et al., Complications at the time of transcatheter aortic valve implantation. *Methodist DeBakey Cardiovasc J*, 2012. **8**(2): p. 38-41.
 49. Huang, G. and S.H. Rahimtoola, Prosthetic heart valve. *Circulation*, 2011. **123**(22): p. 2602-2605.
 50. Senthilnathan, V., et al., Heart valves: which is the best choice? *Cardiovascular surgery*, 1999. **7**(4): p. 393-397.
 51. Zilla, P., et al., Prosthetic heart valves: catering for the few. *Biomaterials*, 2008. **29**(4): p. 385-406.
 52. Butany, J., et al., Mechanical heart valve prostheses: identification and evaluation. *Cardiovasc Pathol*, 2003. **12**(1): p. 1-22.
 53. Yoganathan, A.P., et al., The Starr-Edwards aortic ball valve: flow characteristics, thrombus formation, and tissue overgrowth. *Artif Organs*, 1981. **5**(1): p. 6-17.
 54. Ross, D.N., Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet*, 1962. **2**(7254): p. 487.

55. Pillsbury, R.C. and N.E. Shumway, Replacement of the aortic valve with the autologous pulmonic valve. *Surg Forum*, 1966. **17**: p. 176-7.
56. Carpentier, A., The concept of bioprosthesis. *Thoraxchir Vask Chir*, 1971. **19**(5): p. 379-83.
57. Hoffmann, G., G. Lutter, and J. Cremer, Durability of bioprosthetic cardiac valves. *Dtsch Arztebl Int*, 2008. **105**(8): p. 143-8.
58. Feldman, T. and M.B. Leon, Prospects for percutaneous valve therapies. *Circulation*, 2007. **116**(24): p. 2866-77.
59. Ferrari, E. and L.K. von Segesser, Transcatheter aortic valve implantation (TAVI): state of the art techniques and future perspectives. *Swiss Med Wkly*, 2010. **140**: p. w13127.
60. Bax, J.J. and V. Delgado, Bioprosthetic Heart Valves, Thrombosis, Anticoagulation, and Imaging Surveillance. *JACC Cardiovasc Interv*, 2017. **10**(4): p. 388-390.
61. Brown, J.M., et al., Isolated aortic valve replacement in North America comprising 108,687 patients in 10 years: changes in risks, valve types, and outcomes in the Society of Thoracic Surgeons National Database. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009. **137**(1): p. 82-90.
62. Weiser, T.G., et al., Size and distribution of the global volume of surgery in 2012. *Bull World Health Organ*, 2016. **94**(3): p. 201-209F.
63. Langer, R. and J.P. Vacanti, Tissue engineering. *Science*, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
64. Vacanti, C.A., The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med*, 2006. **10**(3): p. 569-76.
65. Howard, D., et al., Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat*, 2008. **213**(1): p. 66-72.
66. Langer, R. and J.P. Vacanti, Artificial organs. *Sci Am*, 1995. **273**(3): p. 130-3.
67. Langer, R.S. and J.P. Vacanti, Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am*, 1999. **280**(4): p. 86-9.
68. Tondeur, S., et al., [Biology and potential of human embryonic stem cells]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2008. **66**(3): p. 241-7.
69. Thomson, J.A. and V.S. Marshall, Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol*, 1998. **38**: p. 133-65.
70. Thomson, J.A., et al., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
71. Thomson, M., et al., Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*, 2011. **145**(6): p. 875-89.
72. Oreffo, R.O., et al., Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 1998. **19**(20): p. 1845-54.
73. D'Ippolito, G., et al., Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*, 1999. **14**(7): p. 1115-22.
74. Brunet, A. and T.A. Rando, Ageing: from stem to stern. *Nature*, 2007. **449**(7160): p. 288-91.
75. Hoerstrup, S.P., et al., Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation*, 2000. **102**(19 Suppl 3): p. III44-9.

76. Hoerstrup, S.P., et al., Fluorescence activated cell sorting: a reliable method in tissue engineering of a bioprosthetic heart valve. *Ann Thorac Surg*, 1998. **66**(5): p. 1653-7.
77. Zund, G., et al., Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery: Seeding of human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1998. **13**(2): p. 160-4.
78. An, J., et al., Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. *Engineering*, 2015. **1**(2): p. 261-268.
79. Yang, S., et al., The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng*, 2002. **8**(1): p. 1-11.
80. Zhai, W., et al., Quercetin-crosslinked porcine heart valve matrix: Mechanical properties, stability, anticalcification and cytocompatibility. *Acta Biomaterialia*, 2010. **6**(2): p. 389-395.
81. Hasan, A., et al., Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomaterialia*, 2014. **10**(1): p. 11-25.
82. Taylor, P.M., A.E.G. Cass, and M.H. Yacoub, Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering heart valves. *Progress in Pediatric Cardiology*, 2006. **21**(2): p. 219-225.
83. Vats, A., et al., Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 2003. **28**(3): p. 165-72.
84. Wintermantel, E. and S.W. Ha, *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*. 2002: Springer Berlin Heidelberg.
85. Gentile, P., et al., An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(3): p. 3640-59.
86. Asghari, F., et al., Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017. **45**(2): p. 185-192.
87. Hadasha, W. and D. Bezuidenhout, *Poly(lactic acid) as Biomaterial for Cardiovascular Devices and Tissue Engineering Applications*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-27.
88. Fallahiarezoudar, E., et al., A review of: application of synthetic scaffold in tissue engineering heart valves. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015. **48**: p. 556-65.
89. Janik, H. and M. Marzec, A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015. **48**: p. 586-91.
90. Mackay, T.G., et al., New polyurethane heart valve prosthesis: design, manufacture and evaluation. *Biomaterials*, 1996. **17**(19): p. 1857-63.
91. Vats, A., et al., Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 2003. **28**(3): p. 165-172.
92. Pompilio, G., et al., [Cellular viability and immune response in homologous cryopreserved cardiac valves]. *Minerva cardioangiologica*, 1997. **45**(5): p. 235-244.
93. Neumann, A., et al., Heart valve engineering: decellularized allograft matrices in clinical practice, in *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*. 2013. p. 453.

94. Hopkins, R., From cadaver harvested homograft valves to tissue-engineered valve conduits. *Progress in Pediatric cardiology*, 2006. **21**(2): p. 137-152.
95. Barron, V., et al., Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review. *Ann Biomed Eng*, 2003. **31**(9): p. 1017-30.
96. Shachar, M. and S. Cohen, Cardiac tissue engineering, ex-vivo: design principles in biomaterials and bioreactors. *Heart Fail Rev*, 2003. **8**(3): p. 271-6.
97. Chen, H.C. and Y.C. Hu, Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnol Lett*, 2006. **28**(18): p. 1415-23.
98. Carrier, R.L., et al., Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng*, 1999. **64**(5): p. 580-9.
99. Bueno, E.M., et al., Increased rate of chondrocyte aggregation in a wavy-walled bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 2004. **88**(6): p. 767-77.
100. Freed, L.E. and G. Vunjak-Novakovic, Microgravity tissue engineering. In *Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997. **33**(5): p. 381-5.
101. Burg, K.J., et al., Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 2000. **51**(4): p. 642-9.
102. Bilodeau, K. and D. Mantovani, Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review. *Tissue Eng*, 2006. **12**(8): p. 2367-83.
103. Niklason, L.E., et al., Functional arteries grown in vitro. *Science*, 1999. **284**(5413): p. 489-93.
104. Eweborn, G.W., et al., The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. the Tromso study. *Heart*, 2013. **99**(6): p. 396-400.
105. Eggebrecht, H. and R.H. Mehta, Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) in Germany 2008-2014: on its way to standard therapy for aortic valve stenosis in the elderly? *EuroIntervention*, 2016. **11**(9): p. 1029-33.
106. Simon, P., et al., Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT® in pediatric patients. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2003. **23**(6): p. 1002-1006.
107. Ducheyne, P., et al., *Comprehensive Biomaterials*. 2015: Elsevier Science.
108. Filova, E., et al., Tissue-engineered heart valves. *Physiol Res*, 2009. **58 Suppl 2**: p. S141-58.
109. Kasimir, M.T., et al., Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis*, 2006. **15**(2): p. 278-86; discussion 286.
110. Taylor, P.M., A.E.G. Cass, and M.H. Yacoub, Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering heart valves. *Progress in Pediatric Cardiology*. **21**(2): p. 219-225.
111. Balachandran, K., P. Sucusky, and A.P. Yoganathan, Hemodynamics and mechanobiology of aortic valve inflammation and calcification. *Int J Inflam*, 2011. **2011**: p. 263870.
112. da Costa, F.D., et al., The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts. *Ann Thorac Surg*, 2010. **90**(6): p. 1854-60.

113. Thierfelder, N., et al., In vitro comparison of novel polyurethane aortic valves and homografts after seeding and conditioning. *ASAIO J*, 2013. **59**(3): p. 309-16.
114. Neuenschwander, S. and S.P. Hoerstrup, Heart valve tissue engineering. *Transpl Immunol*, 2004. **12**(3-4): p. 359-65.
115. Gulbins, H., et al., Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003. **125**(3): p. 592-601.
116. Butcher, J.T., et al., Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(8): p. 1429-34.
117. Schnell, A.M., et al., Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2001. **49**(4): p. 221-5.
118. Sierad, L.N., et al., Design and Testing of a Pulsatile Conditioning System for Dynamic Endothelialization of Polyphenol-Stabilized Tissue Engineered Heart Valves. *Cardiovasc Eng Technol*, 2010. **1**(2): p. 138-153.
119. Alavi, S.H., E.M. Groves, and A. Kheradvar, The effects of transcatheter valve crimping on pericardial leaflets. *Ann Thorac Surg*, 2014. **97**(4): p. 1260-6.
120. Sinning, J.M., et al., Next-generation transcatheter heart valves: current trials in Europe and the USA. *Methodist DeBakey Cardiovasc J*, 2012. **8**(2): p. 9-12.
121. Tang, G.H., et al., Transcatheter aortic valve replacement: current developments, ongoing issues, future outlook. *Cardiol Rev*, 2013. **21**(2): p. 55-76.
122. Al-Lamee, R., C. Godino, and A. Colombo, Transcatheter aortic valve implantation: current principles of patient and technique selection and future perspectives. *Circ Cardiovasc Interv*, 2011. **4**(4): p. 387-95.
123. Yang, L., et al., ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*, 2005. **106**(2): p. 584-92.

11. Abbildungsverzeichnis

- Abb.4.01 Schematische Darstellung des menschlichen Herzens mit abgehenden Gefäßen.
- Abb.4.02 Darstellung der beiden Herzklappentypen.
- Abb.4.03 Schematische Darstellung der Aortenstenose.
- Abb.4.04 Schematische Darstellung der TAVI Verfahren.
- Abb.4.05 Mechanische Herzklappenprothese.
- Abb.4.06 Biologische Herzklappenprothese.
- Abb.4.07 TAVR.
- Abb.5.01 Isolation der Endothelzellen.
- Abb.5.02 Schematische Darstellung der FB-Segmente in der Petrischale.
- Abb.5.03 Aufnahmen der konfluenten Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop.
- Abb.5.04 Kryokonservierte Homograft und ihr Auftauprozess.
- Abb.5.05 Schematische Darstellung der Herstellung der BAP.
- Abb.5.06 Gestentet und auf Teflonhalterung fixierte BAP.
- Abb.5.07 3D Rotationsgerät mit Beschichtungszylinder.
- Abb.5.08 Konditionierungsbioreaktor.
- Abb.5.09 Crimpingsimulation.
- Abb.5.10 Halterung der BAP für die re-Perfusion.
- Abb.5.11 Schematische Darstellung der Probenentnahme nach der re-Perfusion.
- Abb.7.01 Endoskopische Aufnahmen während Perfusion und vektorbasierte Analyse.
- Abb.7.02 Natives und dezellularisiertes PU.
- Abb.7.03 PU Proben nach FB+EC Beschichtung und Konditionierung für 5 Tage.
- Abb.7.04 Gecrimpte und perfundierte SBAP.
- Abb.7.05 Immunzytochemische Färbung der FB.
- Abb.7.06 Immunzytochemische Färbung der EC.
- Abb.7.07 Immunhistochemische Färbung gegen TE-7 nach Beschichtung mit FB+EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion.

- Abb.7.08 Immuhistochemische Färbung gegen CD-31 nach Beschichtung mit FB+EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion.
- Abb.7.09 Immuhistochemische Färbung gegen VE-Cadherin nach Beschichtung mit FB+EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion.
- Abb.7.10 Immuhistochemische Färbung gegen Collagen IV nach Beschichtung mit FB+EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion.
- Abb.7.11 Immuhistochemische Färbung gegen Fibronectin nach Beschichtung mit FB+EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion.
- Abb.7.12 Immuhistochemische Färbung gegen α -Actin nach Beschichtung mit FB+EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion.
- Abb.7.13 Immuhistochemische Färbung gegen Connexin-43 nach Beschichtung mit FB+EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion.
- Abb.7.14 Immuhistochemische Färbung gegen ICAM nach Beschichtung mit FB+EC, Konditionierung, TAVI-Simulation und re-Perfusion.
- Abb.7.15 Live/Dead Färbung vor und nach Crimping sowie re-Perfusion.

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1 Gradeinteilung der Aortenstenose

Tabelle 5.1 Mischungsverhältnisse zur Trypsinierung.

Tabelle 6.1 Demaskierung der Antikörper.

Tabelle 7.1 Zusammengefasste Ergebnisse.

13. Anhang

Zellkultur, Konditionierung und Perfusion

<u>Material</u>	<u>Hersteller/Lieferant</u>	<u>Ref-Nummer</u>
12-Well plates	TPP, Traisadingen, Switzerland, Biochrom	92412
6-Well plates	TPP, Traisadingen, Switzerland, Biochrom	92406
BD Perfusion, Syringe with Needle, 50ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany	30038
Bottle Top Filters 0.2 µm	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark	595-4520
Bottle Top Filters 0.45 µm	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark	295-4545
Calcein AM - LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany	L3224
Cell culture flask T75; T175cm ²	Costar, Corning Incorporated, Corning, USA	3290, 3151
Cell culture flask, T12.5 cm ²	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany	353107
Collagenase Type 2 CLS-2 (253 u/mg)	Worthington Biochemical Corporation / CellSystems GmbH, St. Katharinen, Germany	4176
Cryo Tube vials	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Germany	375418
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany	D5879
Disposable Scalpel, 20	Feather Safety Razor Co., LTD. Medical Division, Japan	02.001.30.020
Endothelial Cell Growth Medium + Supplement Mix	Promocell GmbH, Heidelberg, Germany	C-22010
Fibroblast Growth Medium + Supplement Mix	Promocell GmbH, Heidelberg, Germany	C-23010
Gentamicin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany	15750-037
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany	G4004
HCl (1N)	Pharmacy, University of Munich Hospital, Munich, Germany	L0306

Material	Hersteller/Liferant	Ref-Nummer
Heparin 25000 I.E./5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany	126/317126/ 0403
Human serum albumin 20 %	ZLB Behring, Bern, Switzerland	00257/709
Knopfkanüle (gerade, 1,0x40mm)	Acufirm Ernst Kratz	370-128
Luer slip syringe (20 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany	300296
Medium 199 Earle	Biochrom AG, Berlin, Germany	F0665
Millex-GS filter unit (0.22 µm)	Millipore Corporation, MA, USA	SLGS033SS
Multidirectional stopcock	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany	16494C
Neolus Luer Needle (0.9x70 mm)	Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium	74203-02
PBS	Biochrom AG, Berlin, Germany	L1825
Penicillin-Streptomycin solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany	P4458
Petri Dishes, Cell Culture	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Germany	4021, 172958
Plain Drape, Secu-Drape	Sengewald, clinic innovations, Rohrdorf-Thansau, Germany	504572
Plastic Jars	R.E. Boll oHG, Munich, Germany	3500129
Plastic Screw Cup Storage Bottle, 500 ml	Costar, Corning Incorporated, Corning, USA	8393
PP Tube with screw cap, sterile, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany	210261
PS Multipurpose Container, sterile, 30 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany	201170
Serological Pipettes 1, 2, 5, 10, 25 ml	Costar, Corning Incorporated, Corning, USA	4485, 4486, 4487, 4488, 4489
Silicone-free thermal transfer compound	Fischer Elektronik GmbH und Co. KG, Luedenscheid, Germany	WLPF 20

Material	Hersteller/Liferant	Ref-Nummer
Surgical Gloves sterile	Semperit GmbH, Vienna, Austria	822751805
Suture (3/0)	Resorba, Nuernberg, Germany	91513
Syringe Filter (0.2 µm)	Nalgene, Rochester, NY, USA	19-2520
Transfer Pipette 3.5 ml	Sarstedt AG & Co., Nuembrecht, Germany	86.1171.001
Trypan Blue Solution 0.4 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany	T8154
Trypsin – EDTA Solution (10x)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany	T4174
Vessel Cannules	Medtronic GmbH, Meerbusch, Germany	30004
Water for Injection Ph. Eur. Sterile and pyrogen-free	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germany	1080181
Wide-Mouth Jars 250 ml	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark	2118-0008
Wide-Mouth Jars 950 ml	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark	2118-0032

Rasterelektromikroskopie

Materials	Hersteller/Lieferant	Ref-Nummer
Acetone for analysis	Merck KGaA, Darmstadt, Germany	1.00014.5000
Ethanol 30, 50, 70 and 96 %	Pharmacy, University of Munich Hospital, Munich, Germany
Specimen stubs, 12.5 mm	Bal-Tec GmbH, Schalksmuehle, Germany	G301Z
Probenteller 12.5 mm	NEOLAB	G301Z
Carbon Adesive Leit-Tabs	Baltic Präparation, Koppelheck 34b, 24395 Niesgrau	G3347
Leit-Tabs, 12 mm	NEOLAB	G334
Speicherschachtel für	Baltic Präparation, Koppelheck 34b, 24395 Niesgrau	PAR 140 49-T

Vital/Letal Färbung

Material	Hersteller/Lieferant	Ref-Nummer
Propidiumiodid, 20 ml	Sigma-GmbH, Steinheim, Germany	11348639001
Syto 9, 100 µl	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany	S34854

Immunozyto- und Immunhistochemie

Materials	Hersteller/Lieferant	Ref-Nummer
AEC Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories INC., California, USA	SK-4200
Anti Prolyl-4-Hydroxylase beta Mouse IgG1	Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany	AF 0910-1
Anti-Fibroblast, clone TE-7	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Germany	CBL271
Anti-Fibronectin, rabbit polyclonal serum	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany	F3648
Brij 35-Lösung	Merck KgaA, Darmstadt, Germany	1.01894.0100
Buffer Solution pH 10.00	Mettler Toledo GmbH, Giessen, Germany	513 340 056
Buffer Solution pH 4.01	Mettler Toledo GmbH, Giessen, Germany	513 340 057
Buffer Solution pH 7.00	Mettler Toledo GmbH, Giessen, Germany	513 340 059
Cover Glass, round, 20 mm	Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen, Germany	Z0121405
Culture slides 4-well	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany	354104
Culture slides 8-well	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany	354108
Detection System (HRP Label+ Biotinylated Link)	Biozol, Neu:Fa.Medac	951D-30
EDTA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany	E6635
EnVision Detection Systems Rabbit/Mouse	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany	K4061
Formalin 4 %	Microcos GmbH, Garching, Germany	29188
Hemalaun	Merck KgaA, Darmstadt, Germany	1.09249
Hydrogen Peroxide	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany	21676-3
Monoclonal Antibody VE- Cadherin CD144	Beckmann Coulter Inc., Marseille, France	PN IM1597
Monoclonal Antibody, MS X Connexin 43	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Germany	MAB3067

Materials	Hersteller/Lieferant	Ref-Nummer
Monoclonal Mouse Anti-Collagen, Type IV	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany	C1926
Monoclonal Mouse Anti-Human CD90 (Thy-1)	Dianova GmbH, Hamburg, Germany	DIA100
Monoclonal Mouse Anti-Human Clone CD31 Endothelial Cell	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany	M0823
Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany	M0724
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany	M0851
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Myosin	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany	M-3558
Proteinase K	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany	S3020
Slide Superfrost-OT Plus	Schubert & Weiss-OMNILAB GmbH & Co.KG, Munich, Germany	9161155
Swine Immunoglobulin	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany	X0906
Target Retrieval Solution 10x concentrate	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany	S1699
Tris-Base	Merck KgaA, Darmstadt, Germany	1.08382
Tris-Borate-EDTA, Buffer, 10x concentrate	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany	T4415-4L
Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany	S1964
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	9713.3

Geräte und Ausrüstung

Geräte	Hersteller/Lieferant
Analytical Balance, ABS 770	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Germany
Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Cell Seeding Device	University of Munich Hospital, Munich, Germany
Centrifuge, 5804R	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Centrifuge, Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen, Germany
Centrifuge, Rotina 46R	Hettich, Tuttlingen, Germany
Clamp Forceps	University of Munich Hospital, Munich, Germany
Critical Point Dryer, CPD 30	Bal-Tec GmbH, Schalksmuehle, Germany
Digital Camera EOS 300D	Canon Inc., Japan
Dissecting Scissors	University of Munich Hospital, Munich, Germany
Dressing Forceps	University of Munich Hospital, Munich, Germany
Freezer -20 °C, Comfort Plus	Siemens, Munich, Germany
Freezer -80 °C, HFU86	Kendro Laboratory Products, Hanau, Germany
Frigocut 2700	Leica, Brensheim, Germany
Glass jar with 3 luer connection	Custom Product, Gaßner Glastechnik GmbH, Munich, Germany
High speed CCD Camera	PCO AG, Kelheim, Germany
Incubator	APT line TM CB, Binder GmbH, Tuttlingen, Germany
Incubator	Hera Cell, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Germany
Kidney Bowls	University of Munich Hospital, Munich, Germany
Lab Digital Water Bath	Julabo SW23, Kendro Laboratory Products, Hanau, Germany
Lamina Airflow	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Germany
Leica DMR Microscope + Digital Cam DC 200 & IM50 Software	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany
Light microscope, Axiovert 35	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany
Magnetic stirrers and hot plate	IKA Works, Staufen, Germany
Microwave	Siemens, Munich, Germany
Nalge Nunc Cryo 1 °C Freezing container	Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark

Geräte	Hersteller/Lieferant
Neubauer improved counting chamber	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Germany
Paraffin Tissue Floating Bath, Round Model	Medax GmbH & Co. KG, Rendsburg, Germany
pH-Meter	inoLab, WTW GmbH, Weilheim, Germany
Pipetboy	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Scanning electron microscope, S420	Leica, Brensheim, Germany
Single channel pipettes (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Sputter Coater, SCD 50	Bal-Tec GmbH, Schalksmuehle, Germany
UV-Transilluminator, Rainbow CCTV RMB92	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Germany
Vortex-Mixer, MS1 Mini shaker	IKA Works, Staufen, Germany
Zeiss Axio Observer	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Hagl, der es mir ermöglicht hat die Promotionsarbeit am Institut der herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München durchzuführen.

Dem Betreuer meiner Promotion, Herrn Dr. med. Nikolaus Thierfelder gilt ebenfalls mein besonderer Dank. Seine guten Ratschläge als Mediziner und Wissenschaftler waren in allen Phasen der Promotion – von der Versuchsplanung über die Dissertation bis hin zur Veröffentlichung – eine hervorragende Unterstützung. Seine Tür war bei Unklarheiten und Problemen jederzeit offen.

Herrn Dipl. -Ing. Fabian König danke ich für die technische Unterstützung, insbesondere für die Herstellung der verwendeten Halterung für unsere Herzklappen. Er stand nicht nur in technischer Hinsicht jederzeit zur Verfügung sondern ermöglichte durch seine strukturierte Korrektur einen großen Beitrag zum Zustandekommen unserer Publikation.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Laborwerkstatt des Klinikums, für die Unterstützung bei der Herstellung der Halterung für unsere Herzklappen bedanken.

Herrn Dr. -Ing. Bassil Akra danke ich für die kompetente Beratung und die technische Unterstützung. Ebenso danke ich Frau Dr. -Ing. Trixi Hollweck, die mich bei der Einarbeitung in den Laboralltag begleitet hat und stets großen Rückhalt gezeigt hat.

Frau Ulrike Haas danke ich für die praktische Einweisung im Umgang mit Zellkulturen, deren Kultivierung sowie für die tatkräftige aber auch geduldige und hilfsbereite Unterstützung bei sämtlichen Labortätigkeiten.

Für die Ermöglichung der Verwendung diverser Gerätschaften und Materialien, sowie die hilfreiche Unterstützung bei der Paraffineinbettung vieler Proben sei an dieser Stelle auch Frau Angelika Henn aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung am Klinikum der Universität München dankend erwähnt.

Schließlich gebührt mein Dank und alle Ehre Gott, meiner gesamten Familie, vor allem meiner Frau, Hyun-Jeong, die mir stets mit ihrer Liebe den nötigen Rückhalt gegeben hat.

Veröffentlichung

In folgenden Originalartikeln und Kongressbeiträgen wurden bereits Teile dieser Dissertation publiziert:

Originalartikel in Fachzeitschriften:

‡Koenig Fabian, ‡**Lee Jang-Sun**, Akra Bassil, Hollweck Trixi, Wintermantel Erich, Hagl Christian, Thierfelder Nikolaus. *Is Transcatheter Aortic Valve Implantation of Living Tissue-Engineered Valves Feasible? An In Vitro Evaluation Utilizing a Decellularized and Reseeded Biohybrid Valve*. *Artificial Organs*, 2016 Aug;40 (8): 727-37

Kongressbeiträge:

Lee J., Thierfelder N., König F., Haas U., Fano C., Hollweck T., Schmitz C., Hagl C., Akra B. (2014): *In Vitro Evaluation of a Newly Developed Biohybrid Tissue Engineered Aortic Valve Scaffold for TAVI-Application*, Congress of the Biennial Heart Valve Biology & Tissue Engineering Meeting by the Society for Heart Valve Disease 2014, 10-12.09.2014, London, England

Thierfelder N., **Lee J.**, Helm M., Yniguez F., Steinl B., Bezuidenhout D., Hagl C., König F. (2017): *Where to go in cardiovascular research? A comprehensive evaluation of different tissue engineering and regenerative approaches*, European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2017, 26-30.07.2017, Davos, Switzerland

Eidesstattliche Versicherung

Lee, Jang Sun

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

In-vitro Evaluation einer neu entwickelten bio-hybriden tissue-engineerten Aortenklappenprothese zur TAVI-Applikation

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 26.03.2018

Ort, Datum

Lee, Jang-Sun

Unterschrift Doktorand