

Aus der Klinik für Herzchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. A. Lichtenberg

Etablierung und Charakterisierung eines voll automatisierten computergesteuerten
Bioreaktors zur artifiziellen Kalzifizierung von ovinen Aortenklappen unter physiologi-
schen Parametern und Flussbedingungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Sabine Feichtner

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. Ragnar Huhn-Wientgen

Widmung

Für meine Familie, die mich immer unterstützte.

The practice of medicine is an art, not a trade; a calling, not a business; a calling in which your heart will be exercised equally with your head.

- Sir William Osler (1849 – 1919)

I. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aortenklappenstenose (AKS) ist die häufigste erworbene Herzklappenerkrankung in den Industriestaaten und führt unbehandelt zu Linksherzinsuffizienz und zum Tod. Momentan besteht die einzige Therapie im Ersatz der Klappe, da die zu Grunde liegenden Mechanismen dieser Erkrankung noch nicht vollständig verstanden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *ex vivo* Modell zur Kultivierung einer kompletten nativen Aortenklappenbasis mit einem pulsatilem Strömungsprofil etabliert. Über die automatische Adjustierung der Temperatur, des Drucks und des pH's konnte der computergesteuerte Bioreaktor physiologische Bedingungen aufrecht erhalten. Zunächst wurde das System in Vorversuchen optimiert und dadurch die Anzahl der erfolgreichen Läufe verdreifacht. Die Aortenklappentaschen ovinen Ursprungs wurden nach einer siebentägigen, vollautomatisierten Kultivierung unter kalzifizierenden Bedingungen histologisch und mittels eines biochemischen Assay's zur Quantifizierung der Kalzifizierung untersucht.

In der groben Durchsicht von Gewebeschnitten nach HE-Färbung zeigten sich im histologischen Aufbau keine Unterschiede zwischen frischen Aortenklappentaschen und solchen, die unter Standard- oder kalzifizierenden Bedingungen im Bioreaktor kultiviert wurden. Um eine deutlichere Aussage zum Strukturhalt treffen zu können wurde eine Movat-Pentachrom-Färbung durchgeführt, und so ein Erhalt der dreischichtigen Struktur nachgewiesen. Anhand der Immunfluoreszenzfärbung des Endothelzellmarkers von-Willebrand-Faktor und des in Endothel und valvulären Interstitialzellen (VIC) exprimierten Vimentin konnte ein Erhalt der VIC's bei den kultivierten Aortenklappentaschen im Vergleich zu den nativen Aortenklappentaschen festgestellt werden. Jedoch wurde ein Verlust des Endothels bei den kultivierten Klappentaschen im Vergleich zu frischen Klappentaschen verzeichnet. Allerdings wurde eine erhaltene Vitalität im gesamten Klappengewebe gezeigt. Diesen Ergebnissen folgend lässt sich der Bioreaktor als weitestgehend biokompatibel einstufen.

Interessanterweise wurde in der von-Kossa-Färbung eine deutliche Kalzifizierung der unter kalzifizierenden Bedingungen kultivierten Klappentaschen im Vergleich zu den Kontrollen sichtbar. Dabei war nicht nur eine oberflächliche, sondern auch eine infiltrative Kalzifizierung zu beobachten. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte auch im quantitativen Assay ein erhöhter Kalziumgehalt in den unter kalzifizierenden Bedingungen kultivierten Aortenklappentaschen festgestellt werden. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant, zeigten jedoch trotz der kleinen Stichprobe eine deutliche Tendenz ($p=0,1$).

Die aktuellen Ergebnisse legen nahe, dass der Bioreaktor ein vielversprechendes Modell zur artifiziellen *ex vivo* Kalzifizierung von nativen Aortenklappentaschen darstellen könnte. Zukünftige Untersuchungen werden sich mit den Auswirkungen der Bioreaktor-Kultivierung auf die Genexpression und den Proteinhaushalt befassen. Im Zusammenspiel mit bereits bekannten *in vivo* und *in vitro* Modellen könnte der vorgestellte Bioreaktor in Zukunft einen wertvollen Beitrag zur Ursachen- und Therapieforschung der Degeneration von Aortenklappen leisten.

II. **ABSTRACT**

Calcific aortic valve disease is the most common valve disease in developed countries and leads, if left untreated, to left heart failure and finally to death. The only treatment is replacing the diseased valve, since underlying mechanisms are not fully understood. Thus a suitable model to investigate these mechanisms is necessary.

In this study an *ex vivo* model was established as a method to cultivate native ovine aortic valves under physiological conditions and a pulsatile flow profile. The computer-controlled bioreactor maintained these conditions via automated control and regulation of temperature, pressure and pH adjustment. The bioreactor handling was optimized in preliminary tests and the success rate of cultivations was tripled. Ovine aortic valves were cultivated *ex vivo* for seven days using control or pro-degenerative conditions. Readout analysis was performed using histological analysis and a biochemical calcium quantification assay.

Hematoxylin and eosin stain showed no structural differences between the native aortic valves and aortic valves cultivated in control or pro-degenerative conditions. The typical three-layered structure of aortic leaflets was detected using Movat-pentachrome staining and revealed no differences between native and cultivated aortic valves. In addition an immune fluorescence staining of von-Willebrand-factor (Endothelial cell marker) and vimentin (endothelial and valvular interstitial cell marker (VIC)) was conducted. While the amount of VIC stayed the same in native and *ex vivo* cultivated aortic valves, a loss of endothelial cells was observed after bioreactor cultivation compared to native aortic valves. However, general cell viability was observed throughout the valve tissue. Following these results the bioreactor can be seen as biocompatible.

Furthermore calcium deposits could be found in aortic valves cultivated in pro-degenerative conditions via von-Kossa-staining, but not under native and control conditions. These calcium deposits were not only found on the surface but also inside the tissue of the aortic valves. The results of the von-Kossa-staining were confirmed by quantitative assay measuring tissue calcium content. Although results were not statistically significant, a clear tendency ($p=0.1$) was observed despite small number of replicates. Thus cultivation using pro-degenerative conditions was capable of inducing calcific degeneration in aortic valves.

The current results suggest that the bioreactor is a sufficient *ex vivo* model to induce calcific degeneration in aortic valves. Future studies will focus on the effects of bioreactor cultivation on RNA and protein expression levels. In combination with current *in vivo* and *in vitro* studies the bioreactor could be a useful model to investigate the causes of calcific aortic valve disease and to develop novel treatment strategies against this disease.

III. **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

1/min	Umdrehungen pro Minute
AKS	Aortenklappenstenose
β -GP	β -Glycerophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälber Serum
h	Stunde
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
KÖF	Klappenöffnungsfläche
Ltr/min	Liter pro Minute
m/s	Meter pro Sekunde
mBar	Millibar
mM	Millimol pro Liter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
rpm	Umdrehungen pro Minute
TAVI	Transkatheteraortenklappenersatz
TGF- β	Transforming Growth Factor β
U	Units
VIC	valvuläre Interstitialzelle
vWF	von-Willebrand-Faktor

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Die Aortenklappenstenose	1
1.1.1 Aufbau und Funktion der Aortenklappe	1
1.1.3 Therapien und Therapieansätze	3
1.1.4 Ursachenforschung	6
1.2 Bioreaktoren als ex-vivo-Modelle	7
1.3 Ziele der Arbeit.....	8
2. MATERIAL UND METHODIK.....	11
2.1 Material	11
2.1.1 Präparation, Kryokonservierung & Bioreaktor	11
2.1.2 Färbungen	12
2.1.3 Kalzium Assay	14
2.2 Aufbau des Bioreaktors.....	15
2.3 Methodik	22
2.3.1 Präparation der Aortenklappentaschen samt Aortenwurzel.....	22
2.3.2 Kryokonservierung der Aortenklappenbasen.....	22
2.3.3 Durchlauf im Bioreaktorsystem unter physiologischen Parametern und Flussbedingungen	23
2.3.4 Färbungen	24
2.3.4.1 Kryoschnitte	25
2.3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	25
2.3.4.3 Movat-Pentachrom-Färbung	25
2.3.4.4 Immunfluoreszenz-Färbung mit Vimentin und vWF	26

2.3.4.5 Von-Kossa-Färbung	27
2.3.5 Kalzium-Assay	27
2.3.6 Datenverarbeitung und statistisches Verfahren	28
3. ERGEBNISSE	30
3.1 Optimierung des Bioreaktorsystems	30
3.2 Ergebnisse der Systemsteuerung des Bioreaktorsystems	33
3.2.1 Verlauf der Mediumflusswerte	33
3.2.2 Verlauf der Temperatur	34
3.2.3 Verlauf der Druck- & pH-Werte in Bezug auf den Gasfluss	35
3.2.4 Verlauf der O ₂ -Werte	38
3.3 Untersuchungsergebnisse der kultivierten Aortenklappentaschen.....	39
3.3.1 Makroskopische Ergebnisse.....	39
3.3.2 Histologische Darstellungen	40
3.3.2.1 HE-Färbung	40
3.3.2.2 Movat-Pentachrom-Färbung	41
3.3.2.3 Immunfluoreszenz-Färbung auf Vimentin & vWF.....	43
3.3.2.4 Von-Kossa-Färbung.....	44
3.3.3 Kalzium Assay	46
4. DISKUSSION	47
4.1 Beurteilung der Optimierungen und des Versuchsablaufs	47
4.2 Beurteilung der Biokompatibilität.....	51
4.3 Beurteilung der Kalzifizierung	54
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	57
6. ANHANG	69
DANKSAGUNGEN	

1. ***EINLEITUNG***

„There are two objects of medical education: To heal the sick and to advance the science.”

- Charles Horace Mayo (1865-1939)

Die Aortenklappenstenose (AKS) ist heutzutage die häufigste Herzklappenerkrankung in den Industriestaaten [1]. Im Jahre 2015 ermittelte das Robert-Koch-Institut und das statistische Bundesamt im Rahmen der Gesundheitsberichterstattung, dass 42.090 Menschen in Deutschland wegen AKS stationär behandelt wurden und 9.580 Menschen an den Folgen einer AKS verstarben. Dabei war die Mehrzahl der Patienten über 65 Jahre alt [2, 3]. Die genauen Ursachen sind noch nicht vollständig geklärt, sodass momentan die einzige langfristige Behandlung im Ersatz der erkrankten Klappe besteht. Zur weiteren Erforschung sind möglichst physiologische Studienmodelle von Nöten. In der vorliegenden Arbeit soll ein entsprechendes ex-vivo-Modell etabliert werden.

1.1 **Die Aortenklappenstenose**

1.1.1 ***Aufbau und Funktion der Aortenklappe***

Die Aortenklappe (Valva aortae) gehört neben der Pulmonalklappe zu den Taschenklappen. Diese sind aus drei halbmondförmigen Membrantaschen (Valvulae semilunares) mit freien, nach oben ausgerichteten, Rändern aufgebaut. An diesen Rändern sitzen Knötchen (Noduli valvulae semilunaris) neben einem Saum (Lunula valvulae semilunaris), die zusammen für einen dichten Schluss der Aortenklappe sorgen. Die Aortenklappe befindet sich zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta ascendens. Als eine Art Rückschlagventil sorgt dieser Aufbau dafür, dass das Blut nur in eine Richtung fließt und ein Rückstrom verhindert wird [4].

Histologisch gesehen ist die Aortenklappe wie die anderen Herzklappen ein Teil des Endokards und bis auf die Basis gefäßfrei. Sie besteht aus drei Schichten, die sich in ihrem Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM) unterscheiden: der

Lamina fibrosa auf der Aortenseite, der Lamina spongiosa und der Lamina ventricularis auf der Ventrikelseite.

Die EZM ist unter anderem für die Form, die Elastizität und die Signaltransduktion, sowie die Wundheilung des Gewebes verantwortlich [5, 6]. In allen Schichten befinden sich valvuläre Interstitialzellen (VIC), welche wichtig für die Synthese von der EZM sind. Beidseitig sind valvuläre Endothelzellen zu finden, die den vaskulären Endothelzellen sehr ähnlich sind und eine Barrierefunktion ausüben [7, 8].

Die Lamina fibrosa besteht hauptsächlich aus dem Strukturprotein Kollagen Typ I. In der Lamina spongiosa produzieren VIC's vornehmlich Glykosaminoglykane und Hyaluronan als Bestandteile der Grundsubstanz. Die Lamina ventricularis besteht hauptsächlich aus elastischen Fasern, wodurch sich diese Schicht durch eine besonders hohe Elastizität und Spannkraft auszeichnet [5, 6].

1.1.2 Krankheitsbild der Aortenklappenstenose

Die AKS ist die häufigste Erkrankung der Aortenklappe und tritt vor allem bei älteren Menschen auf. Es gibt kongenitale und erworbene Aortenklappenstenosen. Die primär-degenerative, kalzifizierte AKS (senile AKS) ist dabei von den sekundär-degenerativen rheumatoid-entzündlichen AKS zu unterscheiden [9, 10].

In den meisten Fällen bleibt die Erkrankung jahrelang weitgehend asymptomatisch, sodass es häufig abrupt zu einer hämodynamischen Dekompensation kommt [11–13]. Dabei tritt typischerweise die Symptom-Trias der Dyspnoe, der Synkope und der Angina pectoris auf. Weitere Anzeichen einer AKS sind eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit, Schwindel und Orthopnoe. Klinische Untersuchungsmethoden zeigen dabei ein erniedrigtes Schlagvolumen und einen erhöhten Perfusionsdruck, sowie eine erhöhte myokardiale Wandspannung [14]. Ein entscheidender, apparativ quantifizierbarer Parameter ist die Klappenöffnungsfläche (KÖF). Liegt die KÖF unter einem Wert von $2\text{--}4\text{ cm}^2$, kommt es zu einer linksventrikulären Nachlasterhöhungen, die wiederum zu einer konzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels führt. Ab einer bestimmten Grö-

ße des Herzmuskels ist das Gleichgewicht von Sauerstoffbedarf und –zufuhr gestört, was eine belastungsinduzierten subendokardialen Ischämie bei reduziertem Koronarperfusionsdruck und aufgehobener Koronarreserve induziert [9].

Je nach Symptomen und Untersuchungswerten wird die Erkrankung in drei Schweregrade eingeteilt (Tabelle1).

Tabelle 1 Einteilung des Schweregrades der AKS [15]

	Leichte AKS	Mittlere AKS	Schwere AKS
KÖF (cm²)	> 1,5	1 – 1,5	< 1
Druckgradient (mmHg)	< 25	25 – 40	> 40
Flussgeschwindigkeit (m/s)	< 3	3-4	> 4
Symptome	rasche Ermüdung	Schwindel, Angina pectoris	Periphere Zyanose, Synkope

Unbehandelt beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung nach Einsetzen einer Dyspnoe fünf Jahre, nach einer Synkope drei Jahre und nach einer Linksherzinsuffizienz zwei Jahre [9]. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem asymptomatischen Patienten der plötzliche Herztod eintritt, liegt bei unter 1% pro Jahr, wohingegen nach Auftreten von Symptomen die Wahrscheinlichkeit auf 20% ansteigt [16].

1.1.3 Therapien und Therapieansätze

Patienten, die an einer AKS leiden, können mit Medikamenten lediglich symptomatisch behandelt werden, da die Ursachen der Degeneration noch nicht vollständig verstanden sind [17]. Begleitend oder palliativ kann mit Digoxin, Diuretika und Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten behandelt werden, was jedoch heute in Anbetracht der verfügbaren operativen oder interventionellen Methoden eines Aortenklappenersatzes nur noch selten erforderlich ist [18].

In der aktuellen Forschung werden allerdings mehrere medikamentöse Therapieansätze diskutiert und erforscht, wie etwa der Einsatz von Bisphosphonaten, Pioglitazonen [19], Apolipoprotein A-I-Mimetika [20–24] und Cathepsin S [25].

Eine medikamentöse Therapie eignet sich jedoch nur als Überbrückung für den operativen Klappenersatz. Hierbei wird die erkrankte Aortenklappe durch eine mechanische oder eine biologische Klappe ersetzt. Zweiflügelklappen werden bei den mechanischen Klappen bevorzugt und sind beinahe unbegrenzt haltbar, weswegen sie vor allem bei jüngeren Patienten verwendet werden. Aufgrund der Thrombogenität ist eine dauerhafte Antikoagulation mit Kumarinen von Nöten. Heutzutage werden biologische Klappen (Rinder- / Schweine- / Pferdeperikard oder native Schweineklappen) vor allem bei Patienten über 70 oder bei jüngeren Patienten mit erhöhtem Blutungsrisiko verwendet. Sie bedürfen keiner dauerhaften Antikoagulation und verfügen über physiologischere Strömungseigenschaften. Allerdings sind sie nur begrenzt haltbar und können altersabhängig nach 10-15 Jahren bereits rezidivierende degenerative Veränderungen mit relevanten funktionellen Einschränkungen (Stenose und/oder Insuffizienz) aufweisen [26]. Im Jahre 2016 wurden in Deutschland 9.722 biologische und 1.201 mechanische Aortenklappen operativ eingesetzt [27].

Bisher können nur ca. 30-40% der AKS Patienten für eine solche Operation zugelassen werden [28]. Gründe hierfür sind ein fortgeschrittenes Alter, eine linksventrikuläre Dysfunktion oder multiple Komorbiditäten [29–32].

Für Patienten mit einem erhöhten Operationsrisiko wird daher der Transkatheteraortenklappenersatz (TAVI) in Betracht gezogen [33]. Bei dieser Behandlung wird eine biologische Klappenprothese über einen Katheter eingebracht, je nach Modell und Hersteller wird ein selbst-expandierendes Klappenmodell oder auch eine Ballon-expandierbare Prothese eingesetzt [34–44].

Die Erfolgsrate dieser Behandlung liegt bei ca. 90% und geht mit einer geringeren Gesamtbelastung des Patienten im Vergleich zur herkömmlichen offenen Herzoperation einher [34, 35, 37–44]. Kontraindiziert ist dieses Vorgehen bei diversen Komorbiditäten, sodass auch hier nicht jeder Patient behandelt werden kann. Dazu gehören ein Thrombus im linken Ventrikel, eine aktive Endokarditis,

ein erhöhtes Risiko für eine koronare Ostiumobstruktion oder Plaques mit mobilen Thromben in der Aorta oder im Aortenbogen [18].

Da weder bei dem TAVI noch bei dem konventionellen Klappenersatz eine Integration und somit auch kein Wachstum erfolgt, ist diese Behandlungsart für Kinder nicht geeignet. Bei dieser Patientengruppe kann die Operation nach Ross in Betracht gezogen werden [45–47]. Dabei wird die erkrankte Aortenklappe gegen die patienteneigene Pulmonalklappe ausgetauscht [48]. Die fehlende Pulmonalklappe wird durch eine Homograft (menschliche Spenderklappe) ersetzt, da diese weniger degenerativen Prozessen im Niederdrucksystem ausgesetzt ist [49]. Die Ross-Operation ist ein sehr aufwendiges Verfahren und geht mit einer Manipulation an beiden Taschenklappen einher [45].

Bei hämodynamisch instabilen Patienten oder als palliative Maßnahme kann als Überbrückung eine perkutane Ballonvalvuloplastie durchgeführt werden [18]. Mithilfe eines Ballonkatheters wird hierbei die Kalzifizierung gesprengt und die Aortenwurzel leicht dilatiert [50].

Diese Behandlung ist allerdings von rezidivierenden Stenosen und von einer erhöhten Rate an Aortenregurgitation geprägt [17, 51]. Hinzu kommt, dass ein solcher Eingriff für schlechtere Vorraussetzungen für eine spätere Aortenklappenersatz- oder TAVI-Operation sorgen kann, z.B. durch eine Kommissurenavulsion, eine Klappendehiszenz, eine -perforation oder einen -riss [52].

Keine der vorgestellten Therapiemöglichkeiten stellt eine langfristige Heilung dar, und nicht jeder Patient kann zufriedenstellend behandelt werden. Dies liegt vor allem daran, dass die Ursachen der AKS noch nicht vollständig verstanden sind.

1.1.4 Ursachenforschung

Zum jetzigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass der Beginn der senilen AKS in einer mechanischen Belastung liegt [53]. Scherspannung und transvalvulärer Druck erzeugen Endothelschäden an den Klappen [54]. An diese Mikroverletzungen lagern sich Lipide an und haben eine proinflammatorische Wirkung [55, 56].

Die Entzündung wird in der aktuellen Literatur als zentraler Punkt der Erkrankung diskutiert. Solche Entzündungsreaktionen werden auch über das bei Hypertonie ausgeschüttete Angiotensin II ausgelöst, sodass Hypertonie als ein möglicher Risikofaktor für die AKS diskutiert wird [57, 58]. Aufgrund der Entzündungsreaktionen kommt es zu einer Vaskularisierung der gefäßfreien Aortenklappen [59–62]. Durch eine Schlüsselkomponente der Entzündungsreaktion, dem intrazellulären oxidativen Stress, werden reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid und Hyperoxide erzeugt, die eine Kalzifizierung und somit die Entstehung einer AKS fördern [63–66]. Die Hypoxie wird daher ebenfalls als Risikofaktor angesehen.

Begleitend zur Entzündungsreaktion werden die VIC's aktiviert und in einen myofibroblastischen Phänotyp umgewandelt [67]. Durch die nun veränderte EZM ändert sich die Hämodynamik und die zyklische Spannung auf die Aortenklappen erhöht sich [68, 69].

Über einen positiven Feedback-Mechanismus kommt es zu einer erhöhten Expression von alkalischer Phosphatase und anorganisches Phosphat bildet zusammen mit Kalziumionen eine dem Hydroxylapatit ähnliche Struktur [70]. Diese lagert sich einer Matrix, bestehend aus Kollagen, Osteopontin und anderen kleinen Knochenmatrix-Proteinen an. Der Prozess beginnt in der Lamina fibrosa und dehnt sich auf die Lamina spongiosa aus [71–76]. Die daraus resultierende Kalzifizierung wird als eine weitere Schlüsselkomponente der AKS angesehen und ist die letzte Stufe der Manifestation einer AKS.

Zurzeit werden zwei Kalzifizierungsprozesse in Erwägung gezogen: Die dystrophe Kalzifizierung und die osteogene Kalzifizierung. Die dystrophe Form ist ein passiv degenerativer Prozess, im Zuge dessen es zur Anlagerung von Hydroxylapatit Kristallen kommt [77]. Diese Form wird durch *Transforming*

Growth Factor β (TGF- β) induziert, da die myofibroblastischen VIC's durch TGF- β -Signale aktiviert werden [78].

Im Gegensatz dazu steht der aktive Prozess der osteogenen Kalzifizierung, welche durch Knochen- und Knorpelentwicklungsgene reguliert wird [72, 79].

Zusammenfassend werden momentan die mechanische Belastung und die darauffolgende Entzündungsreaktion und Kalzifizierung als Kernpunkte der AKS gesehen. Die genauen Abläufe sind jedoch noch nicht vollständig geklärt und bedürfen weiterer Erforschung.

1.2 Bioreaktoren als ex-vivo-Modelle

Die AKS wurde in diversen *ex-vivo*, *in-vitro* und *in-vivo* Studien untersucht. Dabei bilden *in-vitro* Studien eine gute Basis, da sie schnell sind und eine bessere Kontrolle sowie eine kontrollierte Manipulation von bestimmten Faktoren erlauben. Allerdings ist bei *in-vitro* Studien auch das Risiko gegeben, einen wichtigen Faktor zu übersehen, oder das Modell zu stark zu vereinfachen [80, 81].

In-vivo-Studien bieten demgegenüber eine adäquate Darstellung des komplexen menschlichen Systems. Komorbiditäten, sowie das Anfangsstadium der Erkrankungen können bei diesen Studien näher untersucht werden. Schweine sind die bestmöglichen Modellorganismen für den Menschen, jedoch ist ihre Haltung schwierig und kostenintensiv sowie die Zeitspanne bis zum Erlangen des optimalen Forschungsalters verhältnismäßig lang. Schafe werden ebenso gerne bei kardiovaskulären Versuchen verwendet. Ihr kardiovaskuläres System ist dem des Menschen sehr ähnlich und damit auch der Aufbau der Herzklappen [82]. Jedoch besteht auch hier das Problem der Haltung und der langen Aufzucht, wie bei vielen Großtiermodellen. Mäuse, die einfacher zu halten sind und schneller wachsen, entwickeln von sich aus keine AKS und müssen daher gentechnisch verändert werden. Auch der histologische Aufbau der Aortenklappe unterscheidet sich deutlich von dem des Menschen, was zu irreführenden Resultaten führen kann. An diesen Beispielen erkennt man, dass sich die Unterschiede zwischen Menschen und Tieren nachteilig auswirken und Ergebnisse verfälschen können. Die Auswahl des Tiermodells mit der damit verbunde-

nen Aussagekraft und der experimentellen Machbarkeit muss sorgfältig abgewogen werden. Für die Auswahl eines optimalen Tiermodells müssten die pathogenen Prozesse der AKS im Menschen tiefergehend verstanden werden [83].

Ex-vivo-Studien vereinen in diesem Zusammenhang viele positive Aspekte von *in-vitro* sowie *in-vivo* Studien. Eine *ex-vivo*-Studie ist gut kontrollierbar, schnell durchführbar, und verschiedene Faktoren können verändert werden, um Krankheitsursachen und deren Auswirkungen auf den Grund zu gehen. Unter anderem zählt zu diesen Faktoren, dass ein spezifischer Dehnungsstress appliziert werden kann und dass die Aortensegel in ihrer Gesamtstruktur untersucht werden können. Als Nachbildung der Klappenfunktion stellen *ex-vivo* Studien eine gute Darstellung der *in-vivo* Situation dar.

Bisherige *ex vivo* Bioreaktoren zeigten bereits positive Ergebnisse in Hinsicht auf die artifizielle Kalzifizierung von Aortenklappen. Engelmayer et al. entwickelten einen Dehnungsbioreaktor, der mit Stanzen aus porkinen Aortenklappen 48 Stunden betrieben wurde. Diese kultivierten Aortenklappen zeigten eine Veränderung in der EZM und eine erhöhte Aktivität der myofibroblastischen VIC's [84]. In späteren Jahren entwickelten Sun et al. einen Doppelkonus-Platten-Bioreaktor, welcher ebenfalls mit Stanzen aus porkinen Aortenklappen verwendet wurde. Das Augenmerk lag hierbei vor allem auf der nun regulierbaren seiten-spezifischen Belastung [68]. In diversen Studien wurde nachgewiesen, dass man mit diesem *ex vivo* System eine Kausalität zwischen hämodynamischen Anomalitäten und valvulärer Pathogenese belegen und erzeugen kann [85–87].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass *ex-vivo*-Modelle gegenüber den *in-vivo* und *in-vitro* Modellen diverse Vorteile haben.

1.3 Ziele der Arbeit

Wie in den vorherigen Abschnitten bereits erläutert, handelt es sich bei der AKS um eine schwerwiegende Erkrankung, die derzeit nicht heilbar ist und deren einzige langfristige Therapie im Ersatz der erkrankten Klappe besteht. Dies liegt

vor allem daran, dass die Ätiologie dieser Erkrankung noch nicht vollständig verstanden ist. Zur weiteren Erforschung sind passende Studienmodelle vonnöten.

Das Ziel dieser Dissertation ist es, die Kultivierung von nativen Aortenwurzel-Explantaten in einem voll automatisierten, computergesteuerten Bioreaktor unter zusätzlichen artifiziellen, kalzifizierenden Bedingungen zu etablieren. Basis soll hierbei ein von Stefanie Aubin bereits für eine Fragestellung aus dem Bereich des Tissue Engineering erfolgreich verwendeter Bioreaktor sein, bei der ovine Pulmonalklappen dezellularisiert und die dezellularisierte Matrix mit Endothelzellen rebesiedelt wurde [88].

Für die vorliegende Arbeit werden die physiologischen Kultivierungsparameter dem menschlichen System angepasst. Unter anderem sind dies der valvuläre Druck und das pulsatile Strömungsprofil. Außerdem werden das Medium sowie das Spendergewebe auf die Fragestellung abgestimmt. Des Weiteren wird eine verbesserte Software verwendet, die zu einer stärkeren Automatisierung bei der Regulation führt.

Zunächst soll das System getestet und für die Fragestellung optimiert werden. Etwaige Fehler und Schwachstellen des Bioreaktors sollen in diesen Testläufen erkannt und beseitigt werden, sodass die Funktionalität, die Stabilität und die Sterilität des Systems gewährleistet ist.

Zur Kalzifizierung der Aortenklappentaschen werden einem Standardmedium kalzifizierende Substanzen zugesetzt, während Versuchsansätze mit reinem Standardmedium als Kontrolle dienen. Nach einer Laufdauer von sieben Tagen werden die kultivierten Klappentaschen histologisch untersucht. Als zusätzliche Kontrolle werden die kultivierten mit nativen Aortenklappentaschen verglichen. Das Augenmerk liegt hier auf dem Strukturerhalt zur Sicherung der Biokompatibilität und auf einer möglichen Kalzifizierung. Ein Kalzium Assay soll die Ergebnisse der Histologie untermauern. Ebenso sollen die Ergebnisdaten des Versuchsablaufes graphisch dargestellt werden, um eine Funktionalität des Bioreaktors zu belegen.

Die Ergebnisse dieser Dissertation sollen dazu beitragen, den Bioreaktor als ein zuverlässiges und geeignetes *ex-vivo*-Modell zur Kultivierung und zur künstlichen Kalzifizierung von ovinen Aortenklappentaschen zu etablieren.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1 Material

2.1.1 Präparation, Kryokonservierung & Bioreaktor

Tabelle 2 Geräte und Utensilien für den Bioreaktor

Geräte und Utensilien	Bezugsquelle
Autoklav	Systec GmbH, Linden (DE)
Bioreaktorkammer (Glas)	freundliche Leihgabe Prof. Dr. A. Lichtenberg
Deckel GL45 mit Dichtring	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main (DE)
Easyferm Plus VP 120 (pH – Sonde)	Hamilton, Nevada, (USA)
HeraSafe (Sterilbank)	Thermo Electron Corporation, Karlsruhe (DE)
Konnektor 1/2 x 3/8	CORMED Medizintechnik GmbH & Co. KG, Rüthen (DE)
Konnektor 1/2 x 3/8 mit Öffnung	CORMED Medizintechnik GmbH & Co. KG, Rüthen (DE)
MPX 320-39 (Stecksystem)	Applied Critical Fluids GmbH, Mannheim (DE)
O-Ring 15,5 x 3mm	Arcus GmbH, Seevetal (DE)
Oxygenierungskammer (Glas)	freundliche Leihgabe Prof. Dr. A. Lichtenberg
PC / Software	Engineo GmbH, Kelkheim (DE)
Rollerpumpe	Stöckert Instrumente GmbH, München (DE)
Schlauch 0,5 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Schlauch 4 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Schlauch 12 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Schlauch 12,7 mm (1/2 Zoll)	Reichert Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg (DE)
Schlauch 9,5 mm (3/8 Zoll)	Reichert Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg (DE)
Schlauchschellen Größe 9-14, 12-17, 17-22	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Temperatursonde	Engineo GmbH, Kelkheim (DE)
Verschlussdeckel mit Fräsung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Visiform DO 120 (O ₂ – Sonde)	Hamilton, Nevada, (USA)
Y-Konnektor 3/8 x 3/8 x 1/2	CORMED Medizintechnik GmbH & Co. KG, Rüthen (DE)

Tabelle 3 Chemikalien, Medien und Zusätze für die Kryokonservierung, die Präparation und den Durchlauf des Bioreaktorsystems

Chemikalien, Medien und Zusätze	Bezugsquelle
Amphotericin B	Gilead Sciences, Inc., Foster City (USA)
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Incidin Liquid	Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein (DE)
Kalziumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Nicht essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	BioFroxx GmbH, Einhausen (DE)
β-Glycerophosphat Disodium Pentahydrat (β-GP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)

Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien für die Kryokonservierung, die Präparation und den Bioreaktor

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Druckluft	Air liquide
Filter Midisart 2000	Sartorius AG, Göttingen (DE)
Flüssiger Stickstoff	Air liquide
Kohlenstoffdioxid	Air liquide
Micro-Tube, 1,5 ml	Biosigma S.r.l., Cona (IT)
Petrischalen 9 cm	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Prolene Faden 4-0	Ethicon Products, Norderstedt (DE)
Pumpenschlauch 12,7 mm (1/2 Zoll)	Raumedic AG, Helmbrechts (DE)
Skalpell	Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka (JPN)
Spannbänder groß 4,8 * 361 mm	Thomas & Betts Corporation, Memphis (USA)
Spannbänder klein 100 * 2,5 mm	J.W. Zander GmbH & Co. KG, Freiburg (DE)
Tube 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)

2.1.2 Färbungen

Tabelle 5 Geräte für die Färbungen

Geräte und Utensilien	Bezugsquelle
Kryostat Leica CM 1950	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar (DE)
Systemmikroskop Leica DM 2000	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar (DE)

Tabelle 6 Chemikalien, Medien und Zusätze für die Färbungen

Chemikalien, Medien und Zusätze	Bezugsquelle
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Alcianblau 1%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Alexa 488 (anti-guinea-pig)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Alexa 546 (anti-rabbit)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ammoniumhydroxid 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Brilliant Crocein R	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster (DE)
Cryocombound	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Eisen-Chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Eosin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ethanol 50%, 70 %, 96 %, 100%	Zentralapotheke UKD, Düsseldorf (DE)
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Formalin 4 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Salzsäure 32-37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Isopentan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Jod	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Kaliumjodid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Leica CV Mount	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar (DE)
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt (DE)
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
PBS	BioFroxx GmbH, Einhausen (DE)
Wolframatophosphorsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Pikrinsäure	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Primär-Antikörper von-Willebrand-Faktor (vWF)	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Primär-Antikörper Vimentin	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg (DE)
Safran du Gatinais	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster (DE)
Säurefuchsin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Tween20 Detergent	Merck KGaA, Darmstadt (DE)
Vectashield with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)

Tabelle 7 Verbrauchsmaterialien für die Färbungen

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Cryomold	Weckert Labortechnik, Kitzingen (DE)
Dako-Pen	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Deckgläser	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde (DE)
Faltenfilter	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren (DE)
Objektträger 76x26x1mm	Paul Marienfeld & Co KG, Lauda Königshofen (DE)

2.1.3 Kalzium Assay

Tabelle 8 Geräte für das Kalzium Assay

Geräte und Utensilien	Bezugsquelle
Infinte M1000 PRO	Tecan Group AG, Männedorf (CH)
Heraeus Labofuge 300	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Tabelle 9 Chemikalien, Medien und Zusätze für das Kalzium Assay

Chemikalien, Medien und Zusätze	Bezugsquelle
Complete Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (DE)
HEPES	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Kalzium Assay Kit	Abnova, Taiwan (CHN)
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt (DE)
PhosSTOP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)
Tris HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (DE)

Tabelle 10 Verbrauchsmaterialien für das Kalzium Assay

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide
Micro-Tube, 1,5 ml	Biosigma S.r.l., Cona (IT)
Microwell-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)

2.2 Aufbau des Bioreaktors

Der Bioreaktor besteht aus äußeren Komponenten und Software-Komponenten. Zu den äußeren Komponenten gehören die Rollerpumpe, die Heizmanschette, die Schutzhaube, die Isolierungen, die Druckanlage und das eigentliche Bioreaktorsystem. Zu den Software-Komponenten gehören der PC mit der eigens entwickelten Software und der Schaltkasten.

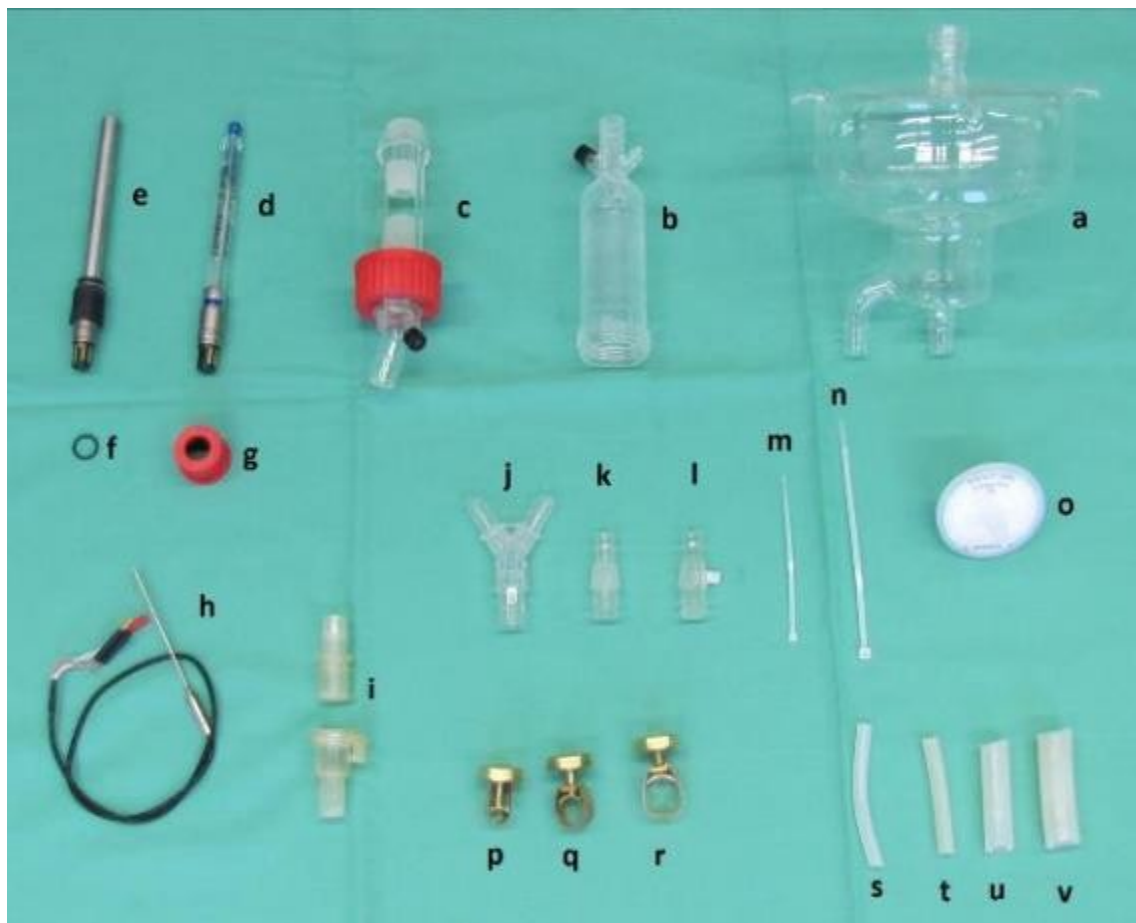


Abb. 1 Einzelkomponenten des Bioreaktorsystems, a: Oxygenierungskammer, b: Äußere Kammerwand, c: Innerer Kammerbereich, d: pH-Sonde, e: O₂-Sonde, f: 15,5 * 3 mm O-Ring, g: Verschlussdeckel mit Fräsung, h: Temperatursonde, i: Stecksystem, j: Y-Konnektor, k: Konnektor, l: Konnektor mit Öffnung, m: Spannband 100 * 2,5 mm, n: Spannband 4,8 * 361 mm, o: Filter, p: Schlauchschelle 14 mm, q: Schlauchschelle 17 mm, r: Schlauchschelle 22 mm, s: Schlauch 0,5 mm, t: Schlauch 4 mm, u: Schlauch 12 mm, v: Schlauch 12,7 mm

Die Oxygenierungskammer (Abb.1, a) gehört zu den gläsernen Komponenten des Bioreaktorsystems und dient dem Austausch von Zu- und Abluft. Sie ver-

fügt über sechs Öffnungen, wobei zwei seitliche Öffnungen mit Schläuchen (t) und Filtern (o) ausgestattet als Zu- und Abluftweg dienen. In die obere Öffnung wird die pH-Sonde (d) mit einem speziell angefertigten Verschlussdeckel (g) und einem Dichtungsring (f) verschraubt. Dabei ist darauf zu achten, dass sich der Dichtungsring im Inneren des Verschlussdeckels direkt an der Öffnung befindet und somit dicht an der pH-Sonde abschließt. Die zentrale untere Öffnung dient mittels eines Schlauches als Verbindungsstelle zur Bioreaktorkammer.

Die Bioreaktorkammer ist eine weitere gläserne Komponente und ist aus zwei Stücken gefertigt: der äußeren Kammerwand (b) und dem inneren Kammerbereich (c). Die Kammerwand ist mit einem Gewinde versehen und kann mithilfe eines Schraubdeckels und einem Dichtring mit dem inneren Kammerbereich verbunden werden. Der innere Kammerbereich besteht aus zwei schmalen gläsernen Stäben und zwei gegenüberliegenden Glasröhrchen sowie drei schmalen Oliven, bei der eine mit einem Gewinde versehen ist. An den beiden Glasröhren werden später Schlauchstücke befestigt, die ein Einnähen der Aortenklappe ermöglichen. Die äußere Kammerwand verfügt über vier weitere Oliven. Die gegenüberliegende Olive wird als Einführungsöffnung für die Temperatursonde (h) genutzt.

Die untere, seitliche Öffnung der Oxygenierungskammer wird über einen Schlauch mit dem Y-Konnektor (j) verbunden. Dort wird die O₂-Sonde (e) angeschlossen und wird über ein Schlauchsystem mit der Bioreaktorkammer und somit dem gesamten Flusssystem verbunden. Dieses Schlauchsystem besteht aus mehreren Teilen und wird über Konnektoren (k, l) und einem speziellen Stecksystem (i) verbunden. Zur optimalen Kompatibilität und Passung werden unterschiedliche Schläuche verwendet. Dadurch wird ebenfalls der Austausch von Verbrauchsmaterialien wie dem Pumpenschlauch (v) erleichtert. Dieser erfordert einen Austausch nach jedem erfolgten Versuch, da die mechanische Belastung durch die Pumpe (Abb. 2A, a) das Material stark beansprucht. Ebenso erleichtert das spezielle Stecksystem das sterile Einnähen der Klappen in die Bioreaktorkammer.

Sämtliche Verbindungsstücke werden mit Schlauchschellen (Abb. 1, p, q, r) und Spannbändern (m, n) gesichert, um eine Dichtigkeit zu garantieren. Offene Oliven, beziehungsweise die verbleibende Öffnung an der Oxygenierungskammer, werden mit Schläuchen (s, t), Spannbändern, Schlauchschellen und Verschlusskappen abgedichtet.

Zur Temperaturreglung wird eine Heizmanschette (Abb. 2 A, c) an das Schlauchstück angelegt und mithilfe von Isolierungsrollen (d) wird eine konstante Temperatur des gesamten Systems aufrechterhalten.

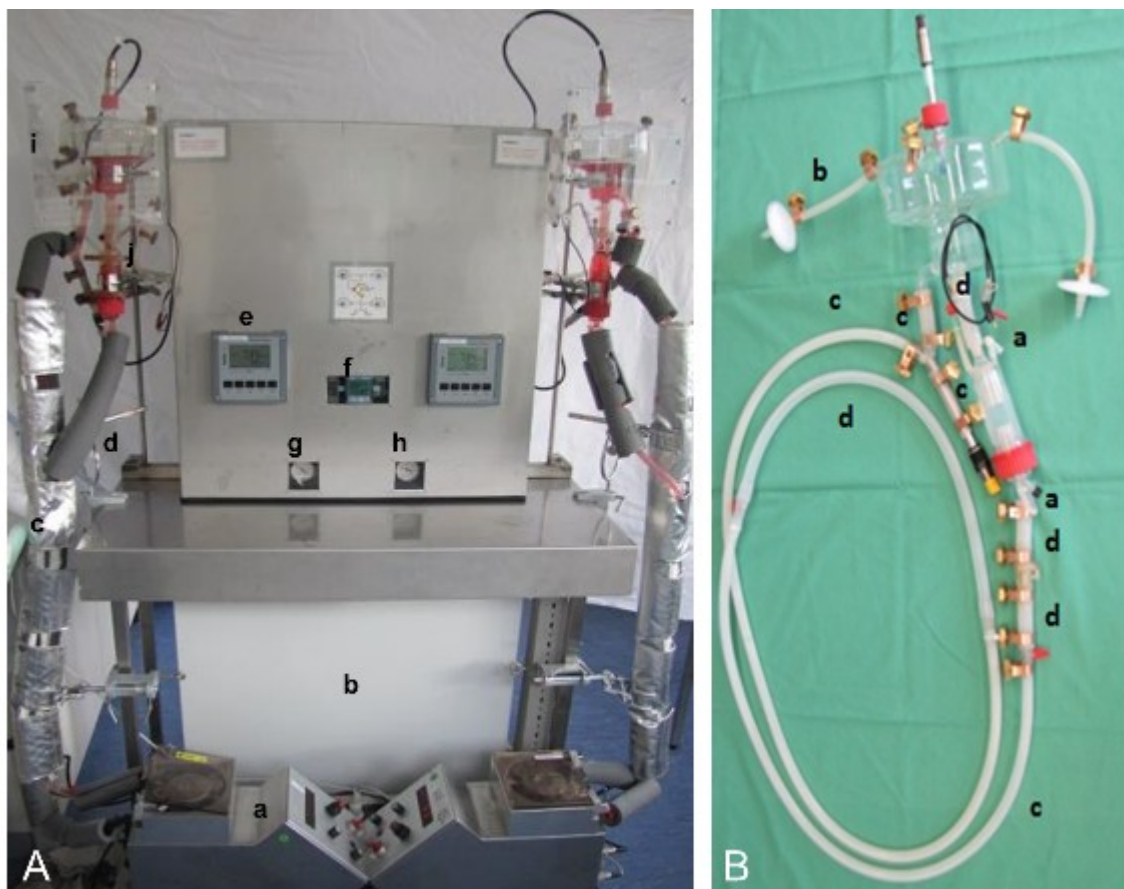


Abb. 2 A Kompletter Bioreaktor; a: Rollerpumpe, b: Schaltkasten, c: Heizmanschette, d: Isolierung, e: pH-Umformer, f: Druckanzeige, g: Barometer CO₂, h: Barometer Druckluft, i: Schutzhaube, j: Bioreaktorsystem **B** Zusammengebautes Bioreaktorsystem; a: Schlauch 0,5 mm b: Schlauch 4 mm c: Schlauch 12 mm d: Schlauch 12,7 mm

Ein konstanter Zufluss von CO₂ und von Druckluft muss für einen optimalen Gasfluss zu jeder Zeit gewährleistet sein und wird in Abbildung 3 grafisch dargestellt. Dafür verfügt das Bioreaktorsystem sowohl über einen Druckluftzugang (Abb.3, I), als auch über einen CO₂-Zugang (H). Wie viel Gas benötigt wird,

wird über den Systemdruck und den pH-Wert bestimmt. Die Regulierung des Druckes bedarf nach Eingabe des Sollwertes keinerlei manueller Steuerung und verläuft vollkommen automatisiert unter der Steuerung der Software. Die Messstationen finden sich hierbei am Druckmesser der Oxygenierungskammer (E) für den Kammerdruck und am Druckmesser des Ausgangs (F) für den Systemdruck. Die entscheidenden Stationen bei der Gasregulation sind dabei die Kammerventile (C, D) für den Zustrom und das 3-Wege-Ventil (B) und dem daran angeschlossenen Ablassventil (G) zur Reduzierung des Druckes, falls dieser zu hoch sein sollte.

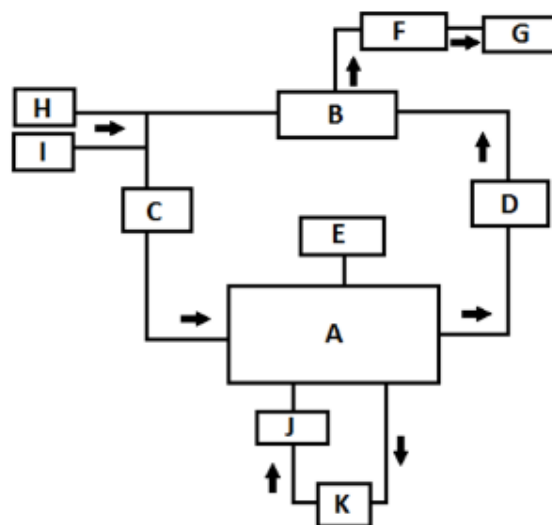


Abb. 3 Gasfluss im Bioreaktorsystem; A: Oxygenierungskammer; B: 3-Wege-Ventil; C: Kammerventil 1; D: Kammerventil 2; E: Druckmesser Kammer; F: Druckmesser Ausgang; G: Ablassventil; H: CO²-Zugang; I: Druckluft-Zugang; J: Bioreaktorkammer; K: Rollerpumpe. Die Pfeile stellen die Richtung des Gasflusses dar. Der Gaskreislauf beginnt bei dem Zugang von CO² und Druckluft (H/I) und schließt sich am Ablassventil (G).

Die eigens programmierte Kontroll- und Steuerungssoftware befindet sich auf einem externen Computer und speichert kontinuierlich Messdaten des Bioreaktorsystems. Durch den konstanten Vergleich der gemessenen Werte mit den Sollwerten kann das System bei etwaigen Abweichungen automatisch gegenregulieren.

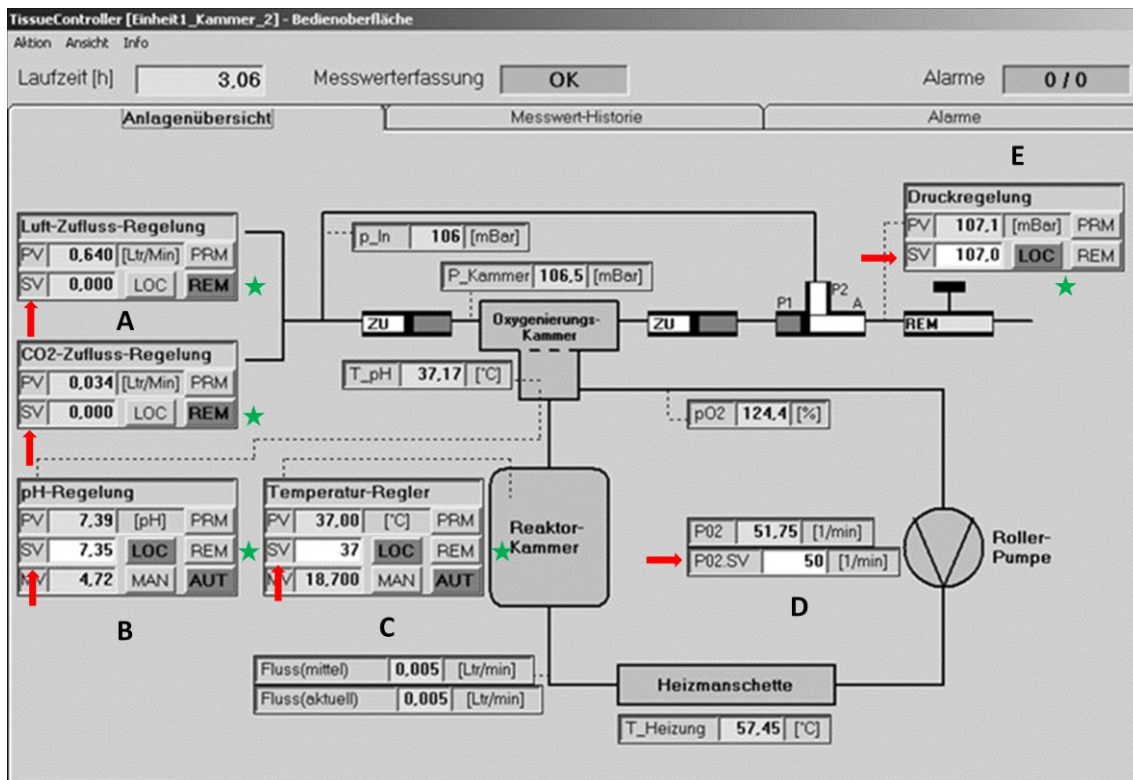


Abb. 4: Screenshot Anlagenübersicht, Eingabe und Übersicht der Sollwerte und aktuellen Werte der Parameter Gasfluss (A), pH (B), Temperatur (C), Pumpengeschwindigkeit (D) und Druck (E). Die Sollwert Einstellungsfelder (SV) sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet, während die Einstellung REM/LOC mit grünen Sternen ausgewiesen sind.

Das eigentliche Steuerungsprogramm besteht aus drei Registerkarten: 1. *Anlagenübersicht*, 2. *Messwert-Historie* und 3. *Alarmer*. Über die Registerkarte *Anlagenübersicht* (Abb. 4) werden die Sollwerte des pH-Wertes, der Temperatur, des Drucks, der Begasung und der Pumpendrehzahl manuell eingegeben (Abb.4 rote Pfeile). Bei den Parametern des Drucks und der Pumpendrehzahl kann der Start- und Endwert sowie die Start- und die Laufzeit eingegeben werden. In einer Zusatzoption wird eingegeben, ob der Endwert gehalten, oder ob ein bestimmter Wert nach Ablauf der Laufzeit erreicht werden soll. Zudem gibt es die Möglichkeit, zwischen REM und LOC zu wählen (Abb. 4 grüne Sterne). Bei der Einstellung REM muss das entsprechende Feld nicht über die Bedienoberfläche bedient werden, sondern der betreffende Parameter wird automatisch von der jeweiligen Bioreaktoreinheit reguliert. Die Einstellung LOC ist das entsprechende Gegenstück dazu, hierbei wird eine manuelle (starre) Vorgabe des betreffenden Parameters vorgenommen. In dieser Arbeit wurde die Einstel-

lung *REM* lediglich bei den Gasflüssen gewählt, da sich diese an den Werten für den Druck und den pH orientierten.

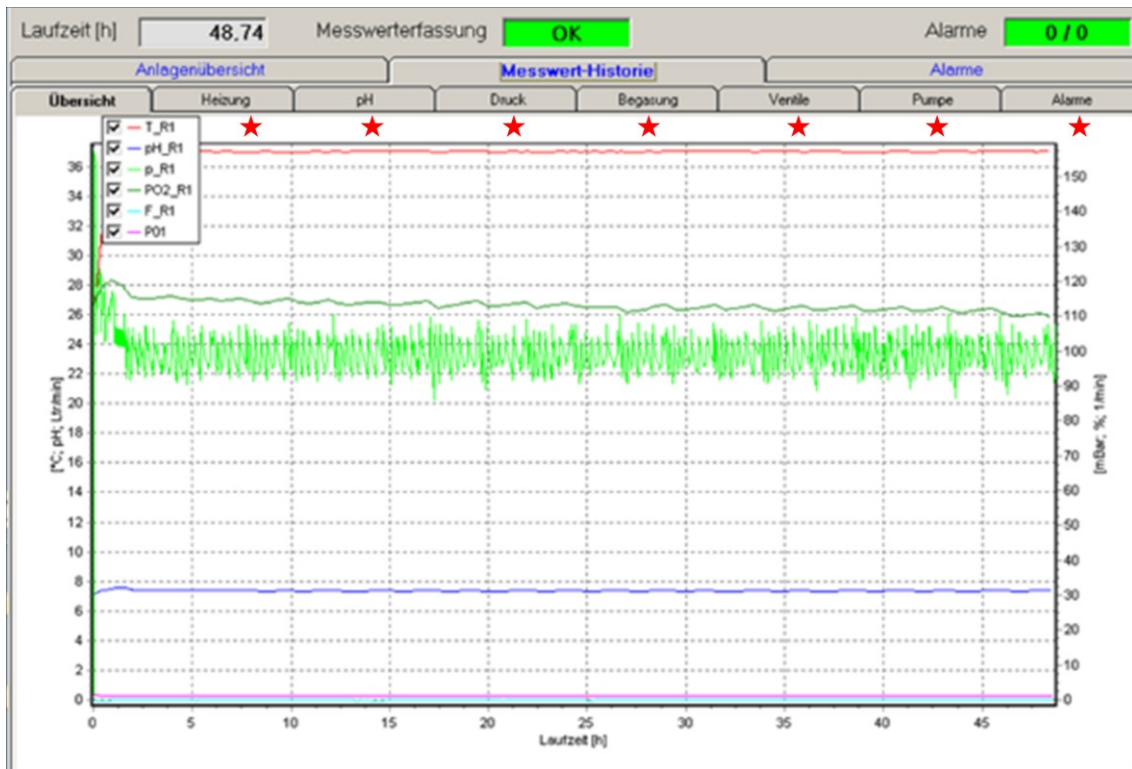


Abb. 5 Screenshot Messwert-Historie – Übersicht der im aktuellen Lauf erfassten Messwerte. In der Registerkarte Übersicht werden die Werte der Temperatur (rote Linie), des pH's (dunkelblaue Linie), des Drucks (hellgrüne Linie) und des Sauerstoffgehalts (dunkelgrüne Linie) dargestellt. Weitere erfasste Werte können in separaten Registerkarten detailliert eingesehen werden (rote Sterne). Die im Screenshot dargestellten Messwerte sind repräsentativ für die durchgeführten Bioreaktorläufe.

In der Registerkarte *Messwert-Historie* (Abb. 5) können sämtliche Parameter eingesehen werden, die vom System gemessen und während des Versuchs aufgezeichnet worden sind. So lässt sich ein reibungsloser Ablauf des Versuches dokumentieren. Nach Ablauf des Versuches können diese Daten in eine *Excel* Tabelle exportiert werden.

Die Registerkarte *Alarme* (Abb. 6) dient als zusätzliche Kontroll- und Warninstanz. Hier werden aktuelle und quittierte Fehlermeldungen angezeigt. Vergangene und somit behobene Alarme können aus dem System ausgelesen werden.

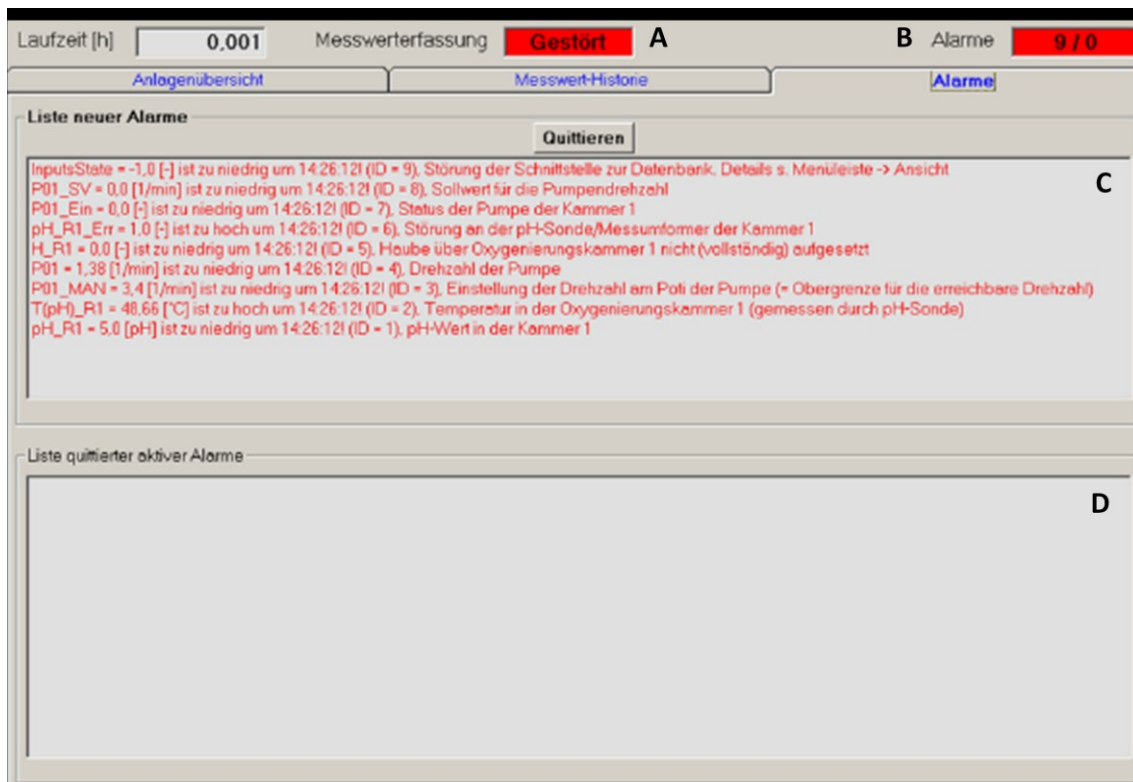


Abb. 6 Screenshot Alarmübersicht als Kontroll- und Warneinheit. In der oberen Leiste lässt sich sofort erkennen, ob ein Fehler vorliegt (A) und die Anzahl dieser Fehler (B). Diese werden in der Liste der neuen Alarm (C) detailliert aufgeführt. Quitierte Fehlermeldungen (D) können weiterhin eingesehen werden. Behobene Fehler werden nicht mehr in der Alarmübersicht angezeigt. Zur Veranschaulichung wurde das Bioreaktorsystem von den Software Komponenten getrennt.

2.3 Methodik

2.3.1 Präparation der Aortenklappentaschen samt Aortenwurzel

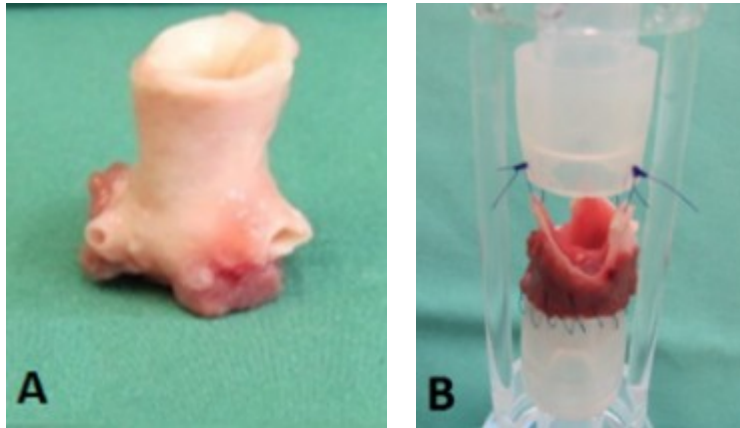


Abb. 7 Präparation der Aortenklappenbasis, A: Präparierte Aorta. Zu sehen sind ein schmaler Myokardring sowie ein Stück der Aorta und deren Gefäßabgängen. **B:** Offen eingenahte Aortenklappenbasis. Zu sehen ist der Myokardring unten und die Kommissuren mit Einzelknopfnähten. Man erhält so Einblick auf die Aortenklappentaschen.

Als Forschungsobjekt für diese Dissertation werden Aortenklappenbasen von Lämmern (Schlachthof Laame GmbH, Wuppertal) genommen. Diese werden unmittelbar nach Schlachtung unter sterilen Bedingungen präpariert. Dabei wird die Aortenklappenbasis sorgfältig vom restlichen Herzgewebe getrennt. Ein schmaler Myokardring an der ventrikulären Seite wird zum sicheren Vernähen zu einem späteren Zeitpunkt belassen (Abb. 8 A). Auf der vaskulären Seite wird die Gefäßwand weitestgehend entfernt. Kleine Bereiche an den Kommissuren werden für das spätere offene Vernähen belassen (Abb. 8 B). Nach Präparation der Basis wird diese in 50 ml Tubes gekühlt gewaschen. Dabei besteht das Lagerungsmedium aus PBS mit Penicillin-Streptomycin (Endkonzentration Penicillin 200 U/ml und Streptomycin 200 µg/ml) und Amphotericin B (Endkonzentration 5 µg/ml).

2.3.2 Kryokonservierung der Aortenklappenbasen

Da der Bezugsort der Aortenklappenbasen außerhalb von Düsseldorf liegt, wird für eine höhere Flexibilität während der Vorversuche eine Kryokonservierung durchgeführt. Nach erfolgter Präparation der Aortenklappenbasis wird diese

unmittelbar in einem konservierenden Medium gelagert. Dieses besteht aus DMEM, 10 % DMSO und 20 % FCS. Danach werden die Präparate auf - 80 °C gefroren. Zum Beginn der Vorversuche wird die Basis in einem 37 °C warmen Wasserbad schnellstmöglich aufgetaut.

2.3.3 Durchlauf im Bioreaktorsystem unter physiologischen Parametern und Flussbedingungen

Vor dem eigentlichen Versuchsdurchlauf wird der Bioreaktor zusammengebaut (s. Abschnitt 2.2) und autoklaviert. Dadurch werden eine vereinfachte Handhabung sowie ein vermindertes Risiko einer Kontamination erreicht. Im Anschluss an das Autoklavieren werden sämtliche Verbindungsstellen bzw. Verschlüsse fest angezogen, um etwaigen Leckagestellen vorzubeugen. Diese müssen beim Autoklavieren gelockert sein, um eine vollständige Sterilisation zu garantieren. Zusätzlich werden die Kombi-Stopper ausgetauscht, da diese nicht autoklavierbar sind. Danach wird am Bioreaktor die Heizmanschette vorgewärmt. Nach Präparation der Aortenklappenbasis wird die ventrikuläre Seite mithilfe einer fortlaufenden Naht am Schlauchstück mittels sterilen OP-Bestecks und chirurgischem Nahtmaterial befestigt. Die vaskuläre Seite wird mittels Einzelknopfnähten an den Kommissuren offen vernäht (Abb. 8 B). Zeitgleich werden die Medien in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 37 °C vorgewärmt. Durch diese schonende Maßnahme soll ein Absterben der Klappenzellen durch thermische Schädigung vermieden werden. Die verwendeten Medien bestehen aus DMEM versetzt mit 10 % FCS, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, Penicillin-Streptomycin (Endkonzentration Penicillin 200 U/ml und Streptomycin 200 µg/ml) und Amphotericin B (Endkonzentration 5 µg/ml). Dem kalzifizierenden Medium wird zusätzlich noch Beta-Glycerolphosphat (β-GP; Endkonzentration 10 mM) und Kalziumchlorid (Endkonzentration 1,5 mM) zugesetzt. Die Medien werden über die pH-Sonden-Öffnung der Oxygenierungskammer eingefüllt. Nach dem Befüllen des Systems mit Medium wird dieses erneut auf etwaige Leckagestellen überprüft, und falls vorhanden werden etwaige Leckagen beseitigt. Diese Schritte erfolgen zur Sicherung gegen Kontamination unter der Sterilbank. Soweit das System leakagefrei ist, wird es am Bioreaktor montiert.

Über die Steuerungssoftware werden über die Registerkarte *Anlagenübersicht* (Abb. 4) bei jedem Versuch die gleichen Parameter eingestellt (Tabelle 11).

Tabelle 11 Parameter-Einstellung

Parameter	Wert
Laufzeit	7 Tage
pH-Sollwert	7,35
Kammerdruck- Sollwert	107 mBar
Temperatur-Sollwert	37 °C
Pumpenprofil	50 rpm

Nach Eingabe der Sollwerte, wird die Software und somit der Versuch über die Regelungsfunktion gestartet. Da der Bioreaktor ein vollautomatisiertes System darstellt, müssen keine Regulierungen von außen vorgenommen werden, nachdem der Lauf gestartet wurde. Lediglich Kontrollen zur Sicherung der Funktionalität und Sterilität erfolgte in regelmäßigen Abständen. Eine Kontrolle der reibungslosen Funktionalität des Bioreaktors wird anhand der Messwerthistorie durchgeführt. Durch visuelle Kontrollen des Mediums auf potenzielle Eintrübungen, Flockung und Verfärbungen werden Kontaminationen ausgeschlossen. Ebenso dient die Beobachtung der O₂-Kurve zum Ausschluss einer Kontamination.

Nach Abschluss des Versuches werden die Aortenklappenbasen aus den Kammern entfernt und gekühlt in PBS gereinigt. Die Taschenklappen werden herauspräpariert und jedes Segel auf mit PBS gefüllten Petrischalen in drei ungefähr gleich große Präparate geschnitten. Die so entstandenen Präparate werden in Micro-Tubes umgelagert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder eingebettet (siehe Abschnitt 2.3.4.1). Bis zur weiteren Verarbeitung werden sie bei – 80 °C gelagert.

2.3.4 Färbungen

Die detaillierte Zusammensetzung von den im folgenden Abschnitt genannten Lösungen und Puffer findet sich im Anhang.

2.3.4.1 Kryoschnitte

Das gewonnene Probenmaterial muss in kleinen Blöcken fixiert werden, um Schnitte anfertigen zu können, die man in weiteren Schritten anfärben kann. Dazu werden die Proben mit einem Einbettmedium (CryoCompound) in sog. *Cryomolds* umschlossen. Das *Cryomold* wird horizontal in ein Gefäß mit Isopentan gegeben, welches sich in flüssigem Stickstoff befindet. Sobald der CryoCompound festgeworden ist, werden die *Cryomolds* bei – 80 °C gelagert. Vor der Anfertigung von Kryoschnitten werden die *Cryomolds* auf - 20 °C aufgewärmt. Die Blöcke werden auf dem Schneidteller des Kryostats fixiert und, nachdem der Überschuss an CryoCompound weggeschnitten wurde, können Gewebeschnitte von 10 µm Dicke angefertigt werden. Die so entstandenen Schnitte werden auf sauberen und staubfreien Objektträgern fixiert und bis zur Weiterverarbeitung bei – 20 °C gelagert.

2.3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) werden saure Strukturen wie beispielsweise DNA, Zellkerne und Ribosome durch Hämatoxylin blau und basische Strukturen wie Zytoplasma, Mitochondrien und Kollagen durch Eosin rot angefärbt. Durch diese histologische Standardfärbung erhält man einen Überblick über die feingewebliche Struktur des Präparates.

Die angefertigten Kryoschnitte werden in Hämatoxylin-Lösung gefärbt und die Färbung mit Hilfe von 4-5 % Essigsäure differenziert. Nach Waschen in 70 % Ethanol wird in Eosin B gegengefärbt. Danach erfolgt eine alkoholische Entwässerungsreihe mit zwei Xylolstufen. Sobald die Schnitte getrocknet sind, werden sie mit Leica CV Mount bedeckt und unter einem Deckglas konserviert und fotodokumentiert.

2.3.4.3 Movat-Pentachrom-Färbung

Durch die Kombination von fünf verschiedenen Farbstoffen erlangt man bei der Movat-Pentachrom-Färbung eine differenzierte Bindegewebsfärbung, was vor allem bei der Beurteilung von kardiovaskulärem Gewebe bevorzugt wird. Dabei werden Zellkerne und elastische Fasern blauschwarz, kollagenes Bindegewebe

hellgelb und die Grundsubstanz des Gewebes blaugrün gefärbt. Muskelgewebe wird in dieser Färbung rot angefärbt.

Nach der Fixierung der Schnitte in 4 % Formalinlösung, werden sie in auf 50 °C erhitze Bouin's Lösung getaucht. Danach werden die Schnitte unter kaltem, fließendem Leitungswasser gespült und in 5 % Natriumthiosulfat fixiert. Anschließend werden die Schnitte in 1 % Alcianblau gefärbt, unter fließendem Leitungswasser gewaschen und in 60 °C warmen alkalischen Alkohol stabilisiert. Es folgt die Färbung in Weigert's Lösung und Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Lösung und eine Fixierung in 5 % Phosphorwolframsäure, wobei zwischen den Schritten mit destilliertem Wasser gewaschen wird. Nach der Differenzierung in 1 % Essigsäure, werden die Schnitte in Ethanol dehydriert und in alkoholischem Safran gefärbt. Eine Spülung in 100 % Ethanol erfolgt mit einer anschließenden Entfettung mit Xylol. Nach dem Trocknen, werden die Schnitte mithilfe von Leica CV Mount konserviert und fotodokumentiert.

2.3.4.4 Immunfluoreszenz-Färbung mit Vimentin und vWF

Mithilfe dieser Färbung werden bestimmte Markerproteine über spezifische Antikörper nachgewiesen, die wiederum ein Nachweis für die Existenz von Endothelzellen und VIC's sind.

Auf dem Objektträger befinden sich eine Probe und eine Negativ-Kontrolle. Die Negativ-Kontrolle wird dabei nicht mit dem Primärantikörper versehen, um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers und um eine Eigenfluoreszenz auszuschließen. Außerdem wird noch eine Positiv-Kontrolle von nativem Myokard benötigt. Hiermit soll die Funktionalität der Antikörper und der Färbung bewiesen werden.

Die Objektträger werden in 4 % Formalin fixiert und in 0,25 % Triton X-Lösung permeabilisiert. Nach dem Umranden der Präparate mit DAKO-Pen werden sie in einer Feuchtkammer mit 5 % BSA-Lösung blockiert. Nach Waschen mit 0,1 % Tween20-Lösung, werden die Proben bei 37°C in den Primärantikörpern inkubiert (Vimentin-spezifischer Meerschweinchenantikörper 1:100 und vWF spezifischer Kaninchenantikörper 1:300 in 1 % BSA Lösung). Die Inkubation der Negativ-Kontrollen erfolgt in 1 % BSA Lösung. Im Anschluss werden die Objektträger in 0,1 % Tween20-Lösung gewaschen und bei 37°C in den Sekundär-

tikörpern inkubiert (Alexa 546 gekoppelter Maus spezifischer und Alexa 488 gekoppelter Meerschweinchen spezifischer Antikörper jeweils 1:200 in 1 % BSA Lösung). Daraufhin erfolgen Waschschritte mit PBS, destilliertem Wasser und 100 % Ethanol. Nach dem Trocknen der Objektträger, werden die Präparate mit DAPI-Vectashield eingedeckt und unter einem Deckglas konserviert und fotodokumentiert.

2.3.4.5 Von-Kossa-Färbung

Bei der von-Kossa-Färbung werden indirekt Kalziumablagerungen über einen Austausch von Kalziumionen gegen Silberionen nachgewiesen. Eine Verkalkung stellt sich bei dieser Färbung schwarz dar. Für einen definitiven Nachweis muss eine Positivkontrolle mitgeführt werden.

Die Kryoschnitte werden in Aceton bei – 20 °C inkubiert und getrocknet. Nachdem sie in destilliertem Wasser equilibriert wurden, werden sie unter einer Neonröhre mit 5 % Silbernitratlösung behandelt, gewaschen und in Natriumkarbonat-Formaldehydlösung reduziert. Nach erneutem Waschen erfolgt eine Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat und die Schnitte werden dann mit einer Alkoholreihe und zwei Xylolstufen entwässert. Nachdem sie getrocknet sind, werden sie mit Leica CV Mount unter einem Deckglas konserviert und fotodokumentiert.

2.3.5 Kalzium-Assay

Zur Messung des intrazellulären Kalziumgehalts wird ein kommerzielles, kolorimetrisches Assay (im Folgenden „Kalzium Assay“ genannt) durchgeführt.

Lysat-Herstellung

Um den Gesamtkalziumgehalt einschließlich des intrazellulären Gehalts an Biomineralisationsherden messen zu können, müssen die Zellen der Gewebeprobe zunächst aufgeschlossen werden. Dazu wird das tiefgefrorene Präparat in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zu einem Pulver zerkleinert. Das so entstandene Pulver wird in einem Lysepuffer gelöst und über

Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Probe wird zentrifugiert und der Überstand wird in ein neues Micro-Tube überführt.

Proteinbestimmung nach Lowry

Mithilfe des Lowry-Tests wird die Proteinkonzentration auf kolorimetrische Weise bestimmt. Kupferionen reagieren mit den Proteinen und Folin-Ciocalteau-Reagenz zu einem blau-violetten Farbstoff, der photometrisch bestimmt werden kann.

Der Lowry-Test wird mit dem Biorad DC Protein Assay erstellt. Dabei wird nach Hersteller Angaben vorgegangen. Mithilfe des Monochromators Infinte[®] M1000 PRO wird die optische Dichte der aufgetragenen Proben mit einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt. Nach Erstellen einer Eichgeraden mithilfe einer Standardreihe erhält man eine Geradengleichung, dank der man die Proteinkonzentration der Proben errechnen kann.

Kalziumbestimmung

Mithilfe des kommerziellen Kalzium Assay's wird die Menge an Kalzium in einer Gewebeprobe bestimmt. Dabei bildet Phenolrot mit Kalzium einen bläulichen Komplex, dessen Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 612 nm bestimmt werden kann. Die Intensität ist dabei proportional zur Kalziumkonzentration.

Es wird nach dem Hersteller Protokoll (Abnova Calcium Assay Kit) verfahren. Die Auswertung des Assay's erfolgt nach Relativierung auf die Proteinkonzentration unter Mitführung einer Eichgeraden.

2.3.6 Datenverarbeitung und statistisches Verfahren

Die von der Software aufgezeichneten Verlaufsdaten werden vom Steuerungscomputer kopiert und mithilfe einer Template-Datei in eine *Excel*-Datei transformiert. Die Alarmdaten werden als *.txt-Datei ausgegeben.

Die deskriptive Statistik wird mit der Software *Microsoft Excel 2016* erstellt. Darunter fallen die Darstellungen der Messwerte des Bioreaktors in Diagrammen, die Berechnung der Eichgeraden über eine Standardreihe und der Protein- und Kalziumkonzentration in einem Diagramm.

Mithilfe von *GraphPad PRISM*[®] 7 werden die gemessenen Werte als Einzelwerte dargestellt. Auch der Standardfehler und der Mittelwert können mit dieser Software veranschaulicht werden. Zur Überprüfung der gemessenen Unterschiede auf statistische Signifikanz wird ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die maximale Irrtumswahrscheinlichkeit α liegt bei 5 %. Damit ist der Unterschied bei einem Signifikanzwert $p \leq 0,05$ signifikant.

3. ERGEBNISSE

Zur Untersuchung der Fragestellung mussten zunächst Optimierungen am bestehenden Bioreaktorsystem und am Versuchsablauf vorgenommen werden. Die gemessenen Parameter der daraus resultierten optimierten Versuchsdurchläufe werden in Flussdiagrammen in Bezug auf die Sollwerte in den folgenden Abschnitten präsentiert und an einem exemplarisch ausgewählten Versuchs dargestellt. Im Anschluss wurden histologische und biochemisch quantitative Untersuchungen an erfolgreichen Kultivierungen durchgeführt, um das Modell zu validieren.

3.1 Optimierung des Bioreaktorsystems

In verschiedenen Vorversuchen wurden Optimierungen am bestehenden Bioreaktorsystem durchgeführt. Der Aufbau des Bioreaktors wurde im Abschnitt 2.2 beschrieben. Für die Testläufe wurden teilweise kryokonservierte Aortenklappentaschen ovinen Ursprungs verwendet. Insgesamt wurden 28 Testläufe im Rahmen der Optimierung durchgeführt.

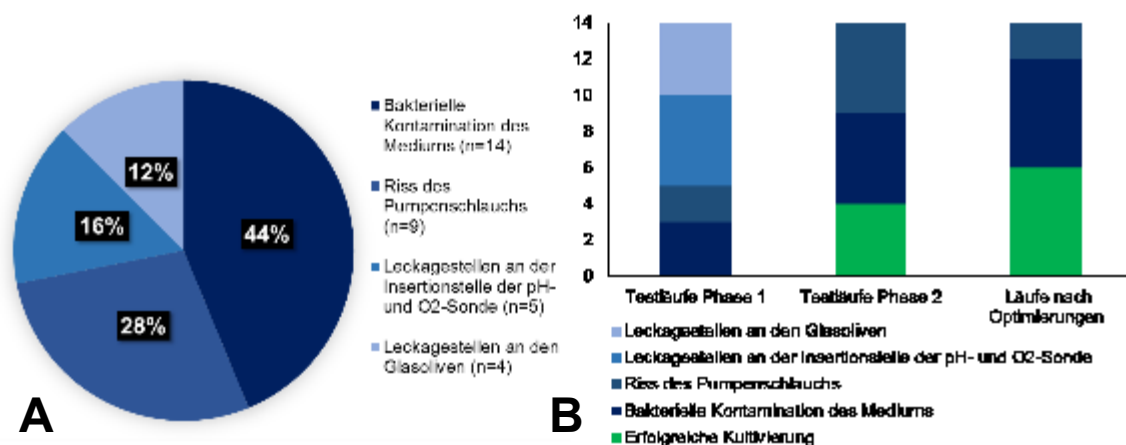


Abb. 8 Probleme und Optimierungen des Bioreaktors im Vergleich, A: Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Probleme, die zum Abbruch der Läufe führten: Bakterielle Kontamination, Riss des Pumpenschlauchs, Leckagestellen an der Insertionsstelle der pH- und O₂-Sonde, Leckagestellen an den Glasoliven; **B:** Dargestellt ist der Vergleich der Anzahl erfolgreiche und fehlgeschlagene Läufe in der Zeit der Testläufe und in der Zeit nach den Optimierungen

In Abb. 8 A ist die prozentuale Verteilung der aufgetretenen Probleme dargestellt:

- Bakterielle Kontamination des Mediums (44%)
- Riss des Pumpenschlauchs (28%)
- Leckagestellen an der Insertionsstelle der pH - und O₂-Sonde (16%)
- Leckagestellen an den Glasoliven (12%)

Diese Probleme konnten folgendermaßen behoben werden:

Um das größte und langwierigste Problem der bakteriellen Kontamination zu beheben, wurde neben Beseitigung der Leckagestellen ein Reinigungsprotokoll entwickelt. Nach jedem kontaminierten Lauf wurde das gesamte Bioreaktorsystem in seine Einzelteile zerlegt, mit destilliertem Wasser gereinigt und für 15 min in Incidin eingelegt. Danach wurden die Bauteile mit destilliertem Wasser gespült, autoklaviert und steril zusammengebaut, bevor das gesamte Bioreaktorsystem vor dem nächsten Versuch erneut autoklaviert wurde. Diese Optimierungen führten zu geringfügigen Verbesserungen (Abb. 8 B, dunkelblauer Balken).

Frühzeitige Pumpenschlauchrisse waren ein weiteres Problem. In den Testläufen wurden verschiedene Schläuche als Pumpenschlauch ausgetestet, um den Schlauch mit den besten Eigenschaften zu ermitteln. Dabei wurde auf den Durchmesser, die Wandstärke und das Material geachtet. Als optimaler Schlauch erwies sich ein speziell für Peristaltikpumpen gefertigter Silikon-schlauch von Raumedic mit einem Durchmesser von 12,7 mm ($\frac{1}{2}$ Zoll). Des Weiteren stellte sich heraus, dass ein wichtiger Faktor für die Langlebigkeit des Schlauches, seine exakte Lage im Pumpensystem ist. Die Anfälligkeit des Systems für Schlauchrisse konnte durch diese Optimierungen erheblich gesenkt werden (Abb. 8 B).

Um die pH-Sonde in die Oxygenierungskammer eingliedern zu können (s. Abschnitt 2.2, Abb. 2 B), musste die Plastikummantelung der Sonde mithilfe einer Säge entfernt werden. Es wurden verschiedene Dichtungsringgrößen und Ver-

schlussdeckel sowie Kombinationen mit Dichtungsring und Verschlussdeckel ausgetestet, um die Undichtigkeit an der Insertionsstelle der pH-Sonde zu beheben (Abb. 9 A). Ein speziell gefräster Verschlussdeckel in Kombination mit einem 15,5*3 mm breiten O-Ring wurde als die effektivste Methode etabliert und konnte Leckagen an dieser Stelle langfristig ausschließen (Abb. 8 B).

Um die Leckagestelle an der O₂-Sonde zu beheben, wurden Schläuche mit verschiedenen Innendurchmessern ausgetestet. Anstatt der bisherigen 12,7 mm (½ Zoll) erwies sich ein Schlauch mit einem Innendurchmesser von 12 mm als optimal, da er enger an der Sonde anlag (Abb. 9 B). In Kombination mit zusätzlichen Schlauchschellen konnte eine Undichtigkeit an dieser Stelle nachhaltig ausgeschlossen werden (Abb. 8 B).

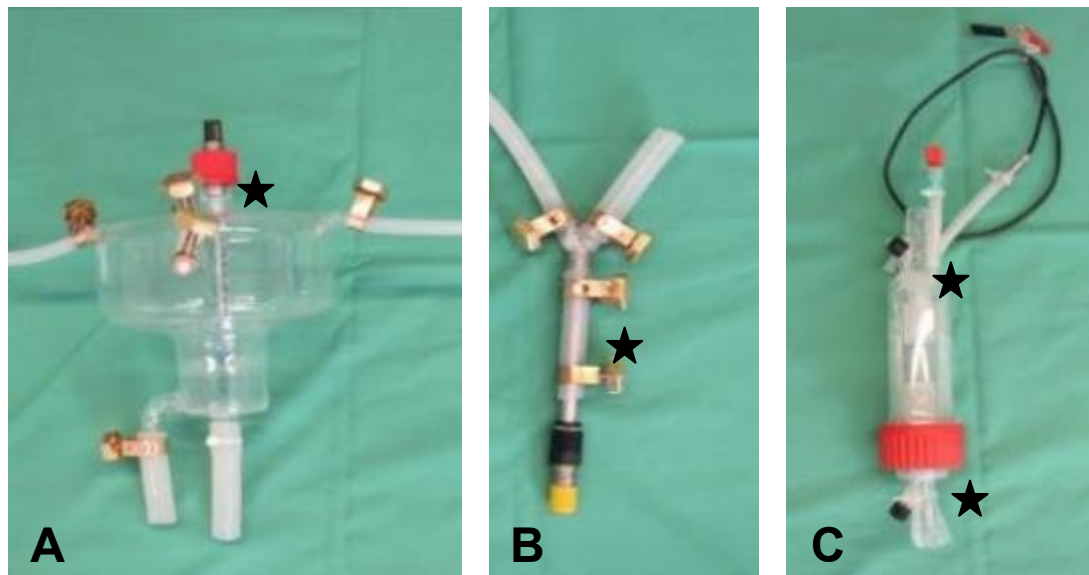


Abb. 9 Optimierungsstellen, An folgenden Stellen (schwarze Sterne) wurden Optimierungen vorgenommen: **A:** Insertionsstelle pH-Sonde in die Oxygenierungskammer, **B:** Insertionsstelle der O₂-Sonde **C:** Untere und obere Oliven der Bioreaktorkammer

In Bezug auf die gehäuft auftretenden Leckagen an den Glasoliven der Bioreaktorkammer wurden in ähnlicher Weise Schläuche mit geringerem Innendurchmesser getestet. Die Schläuche mit einem Durchmesser von 0,5 mm erwiesen sich am wirkungsvollsten (Abb. 9 C) und in Kombination mit einem Spannband konnten auch hier Leckagen nachhaltig vermieden werden (Abb. 8 B).

Nach den erfolgten Optimierungen konnten die Leckagestellen an den Sonden und den Glasoliven gänzlich behoben werden und die Anzahl von Kontaminationen und Pumpenschlauchrissen nahm ab. Insgesamt stieg die Rate von erfolgreichen Bioreaktorläufen über die gesamte Versuchsdauer von sieben Tage von 13,8% auf 42,9% und konnte somit verdreifacht werden (Abb. 8 B).

3.2 Ergebnisse der Systemsteuerung des Bioreaktorsystems

Zur Validierung des Bioreaktorsystems wurden je drei Aortenklappenbasen unter den in Tabelle 11 (s. Abschnitt 2.3.3) genannten Versuchsbedingungen im Bioreaktor kultiviert, wobei zum einen ein kalzifizierendes Medium ($n=3$) und zum anderen ein Kontrollmedium ($n=3$) verwendet wurde. Diese im Bioreaktor kultivierten Aortenklappentaschen wurden zusätzlich mit nativen Aortenklappentaschen ($n=6$) verglichen. Der gesamte Versuchsaufbau wurde bereits im Abschnitt 2.3.3 eingehend beschrieben. Über die im Abschnitt 2.2 besprochene Steuerungssoftware wurden konstant die Messwerte für jeden Lauf aufgezeichnet und in einer Ergebnisdatei gespeichert. Mithilfe einer Excel Datei konnten die gemessenen Parameter in Flussdiagrammen dargestellt werden und sie gaben einen umfassenden Überblick über sämtliche Versuchsparameter. So konnte für alle Versuchsläufe eine konstante Qualität nachgewiesen werden. Nachfolgend sind die erfassten Werte eines Bioreaktorlaufs exemplarisch für die sechs erfolgreich durchgeführten Läufe dargestellt.

3.2.1 Verlauf der Mediumflusswerte

Der Sollwert der Pumpendrehgeschwindigkeit (Abb. 10, schwarze unterbrochene Linie) betrug durchgehend 50 rpm. Die während des Laufs erfasste Pumpengeschwindigkeit ($n=6$; repräsentative Kurve in Abb. 10, grüne Linie) lag bei 51,17 rpm. Der gelegentliche Abfall in der Drehgeschwindigkeit der Pumpe ergibt sich daraus, dass die Pumpe manuell gestoppt wurde, um den Schlauch auf Abrieb und mögliche Risse zu kontrollieren. Dies war aufgrund gelegentlich auftretender Schlauchrisse unvermeidbar und nahm nur wenige Sekunden in Anspruch.

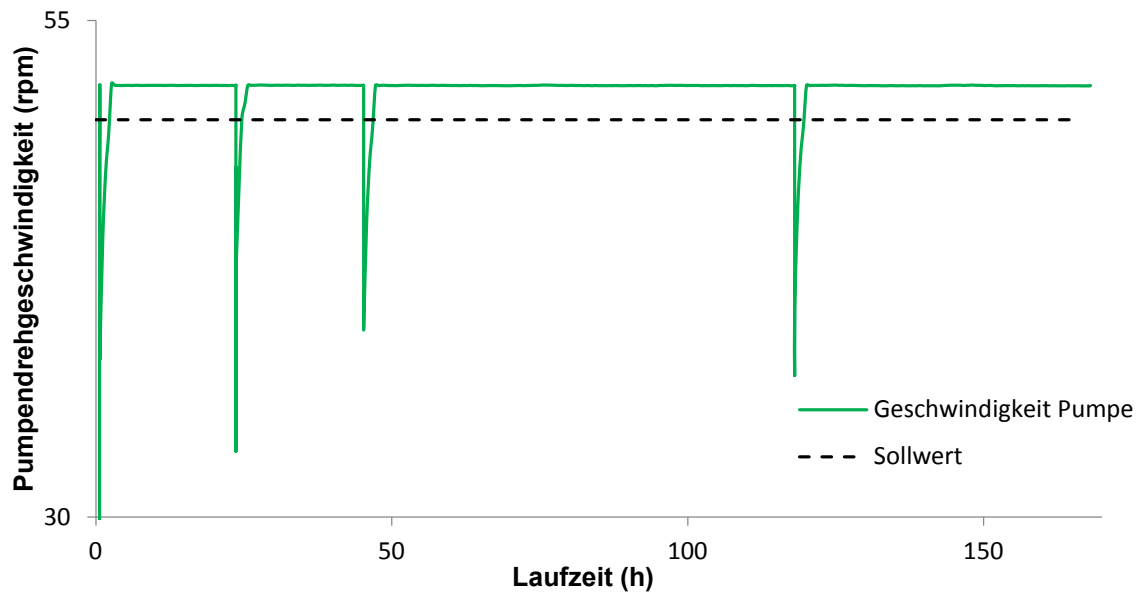


Abb. 10 Pumpendrehgeschwindigkeit im Bioreaktorsystem. Die Geschwindigkeit der Peristaltikpumpe (Umdrehungen pro Minute (rpm)) wurde gegen die Laufzeit aufgetragen. Die dargestellte Skalierung der Y-Achse wurde zur besseren Übersicht gewählt. Sowohl der Sollwert (50 rpm; schwarze, unterbrochene Linie) als auch die tatsächliche Pumpendrehgeschwindigkeit während des Laufes (Durschnitt 51,17 rpm; grüne Linie) sind dargestellt. Der hier dargestellte Lauf steht repräsentativ für $n=6$.

3.2.2 Verlauf der Temperatur

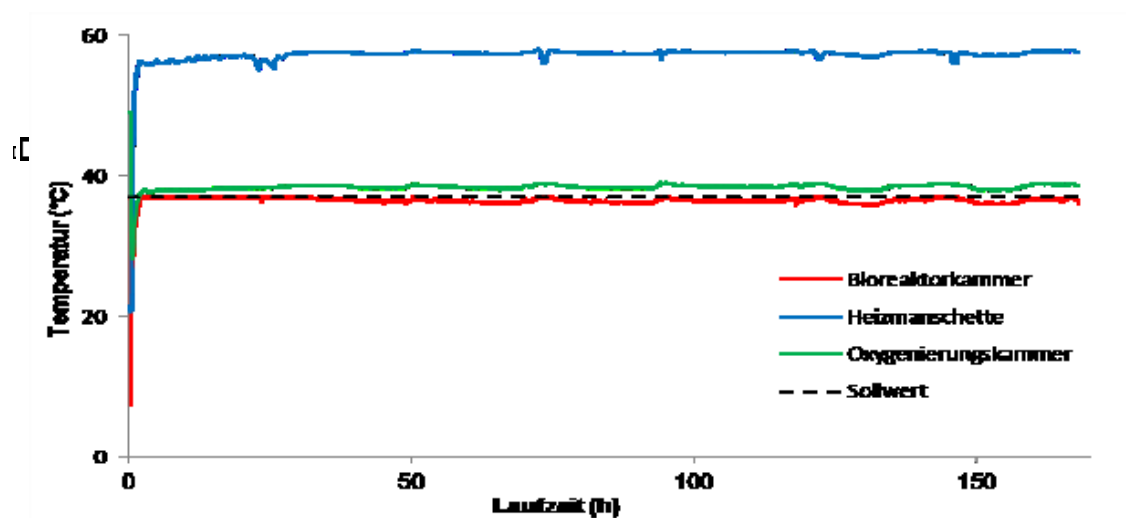


Abb. 11 Temperatur im Bioreaktorsystem. Die Temperatur (°C) wurde gegen die Laufzeit aufgetragen. Der Sollwert (schwarze unterbrochene Linie) wurde zusammen mit den gemessenen Temperaturwerten der Bioreaktorkammer (rote Linie), der Heizmanschette (blaue Linie) und der Oxygenierungskammer (grüne Linie) dargestellt. Der hier dargestellte Lauf steht repräsentativ für $n=6$.

Der Sollwert der Mediumtemperatur lag bei 37 °C (Abb. 11, schwarze unterbrochene Linie). Bei sämtlichen Versuchsläufen wurde diese physiologische Tem-

peratur durchgehend in der Bioreaktorkammer gemessen (n=6; repräsentative Kurve in Abb. 11, rote Linie, Durchschnittswert 36,67 °C). Die Aufrechterhaltung der Solltemperatur erfolgte über die Temperatursteuerung der Heizmanschette (Abb. 11, blaue Linie, Durchschnittswert 57,33 °C) anhand der mit der Temperatursonde (Abb. 11, rote Linie, Durchschnittswert 36,67 °C) erfassten Werte. Des Weiteren erfolgte eine Temperaturerfassung über die pH-Sonde (Abb. 11, grüne Linie, Durchschnittswert 38,39 °C) in der Oxygenierungskammer.

3.2.3 Verlauf der Druck- & pH-Werte in Bezug auf den Gasfluss

Die Druck- und pH-Werte wurden gemäß den vorgegebenen Sollwerten über den Gasfluss im Bioreaktorsystem reguliert. Die Aufrechterhaltung des pH-Wertes (Abb. 12, grüne Linie) wird über den CO₂-Fluss (Abb. 13) geregelt. Sobald der pH-Wert über den Sollwert von 7,35 (Abb. 12, schwarze unterbrochene Linie) stieg, wurde CO₂ in das System geleitet. Der pH wurde sollwertgetreu vom BR-System über den gesamten Lauf stabil gehalten (n=6; repräsentative Kurve des pH-Wert's in Abb. 12, Durchschnittswert 7,35)

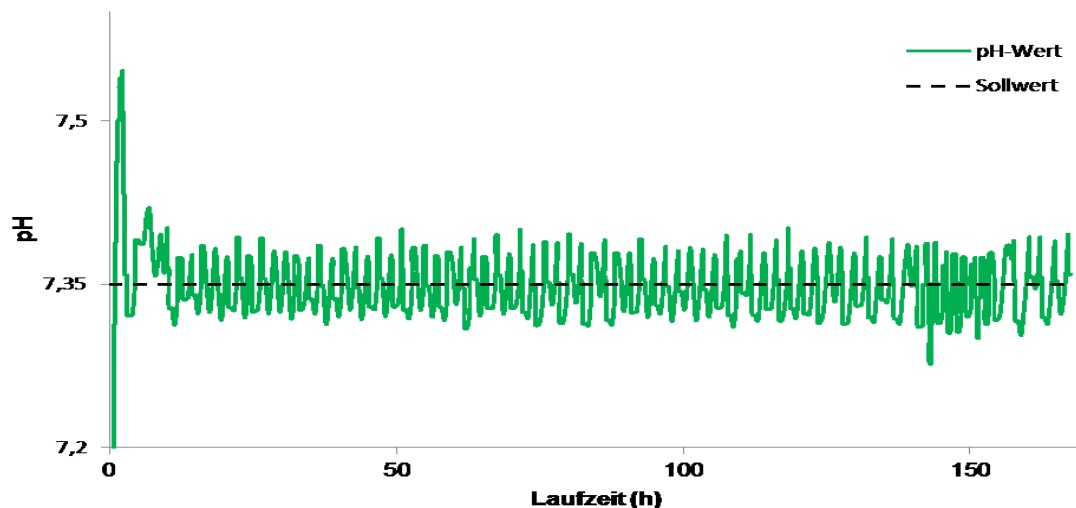


Abb. 12 pH-Wert im Bioreaktorsystem. Die pH-Werte wurden gegen die Laufzeit aufgetragen. Die Skalierung der Y-Achse wurde zur besseren Übersicht gewählt. Sowohl der Sollwert (schwarze unterbrochene Linie) als auch die gemessenen pH-Werte während der Kultivierung (grüne Linie) sind dargestellt. Der Sollwert lag bei 7,35. Der hier dargestellte Lauf steht repräsentativ für n=6.

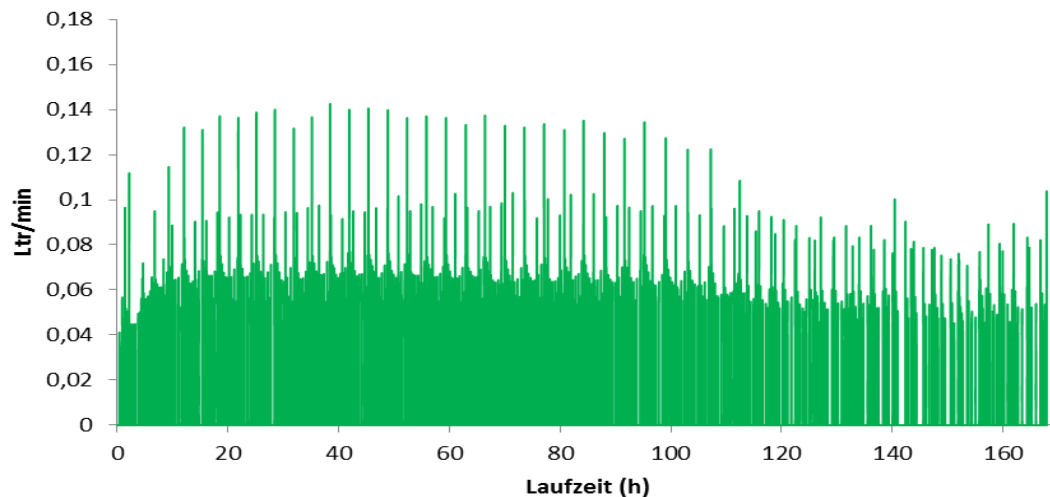


Abb. 13 CO₂-Fluss im Bioreaktorsystem. Der CO₂-Fluss (Liter pro Minute) wurde gegen die Laufzeit aufgetragen. Dargestellt sind die Messwerte während des Laufes (grüne Linie). Die Regulation des CO₂-Flusses erfolgt indirekt über die pH-Regulation, sodass es keinen festen Sollwert gibt. Der hier dargestellte Lauf steht repräsentativ für n=6.

Der Drucksollwert von 107 mBar (Abb.14, schwarze unterbrochene Linie, Durchschnittswert 100,3 mBar) wurde über den Glasfluss durch das Bioreaktorsystem reguliert. Der gesamte Gasfluss wird hauptsächlich durch den Druckluftfluss (Abb. 15) bestimmt, der Einfluss des CO₂-Flussanteils ist niedrig

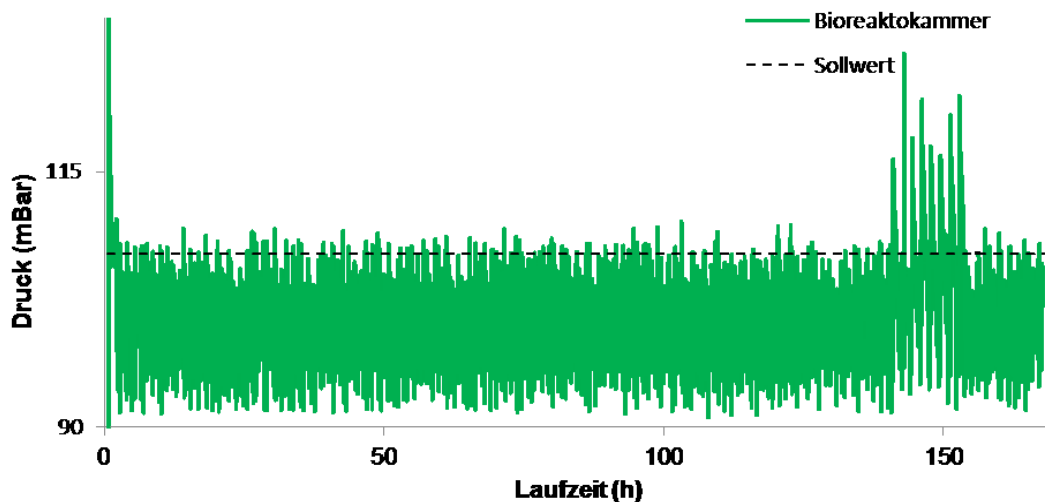


Abb. 14 Druck im Bioreaktorsystem. Die Druckwerte des Kammersystems (mBar) wurden gegen die Laufzeit aufgetragen. Die Skalierung der Y-Achse wurde zur besseren Übersicht gewählt. Der Sollwert wurde mithilfe einer schwarzen unterbrochenen Linie dargestellt, während die Drücke während des Laufs in grün dargestellt wurden. Der Sollwert lag hier bei 107 mBar. Der Durchschnittswert des gemessenen Drucks betrug 100,3 mBar. Der hier dargestellte Lauf steht repräsentativ für n=6.

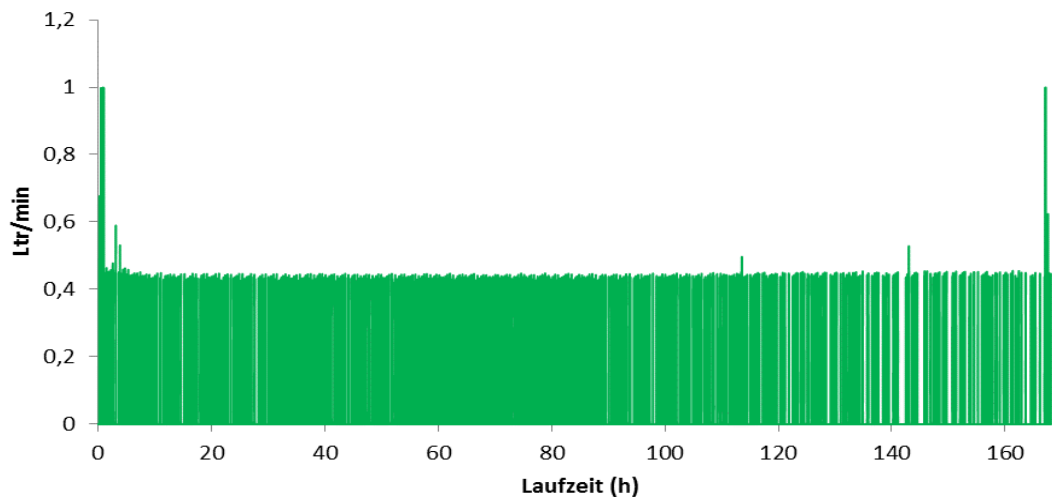


Abb. 15 Druckluftfluss im Bioreaktorsystem. Der Druckluftfluss (Liter pro Minute) wurde gegen die Laufzeit aufgetragen. Dargestellt sind die Messwerte während des Laufes (grüne Linie). Da die Regulation des Flusses indirekt über die Druckregulation erfolgt, gibt es keinen festen Sollwert. Der hier dargestellte Lauf steht repräsentativ für $n=6$.

Sowohl die gemessenen Werte des pH's (Abb. 12, grüne Linie, Durchschnittswert 7,35), als auch die des Drucks (Abb. 14, grüne Linie, Durchschnittswert 100,3 mBar), lagen im Bereich ihrer Sollwerte. Die Graphen unterlagen jedoch geringfügigen Schwankungen, die auf die Aufrechterhaltung der Sollwerte des pH's und des Drucks zurückzuführen sind. Dazu musste wie oben beschrieben der Fluss von Druckluft und CO_2 bedarfsgerecht reguliert werden. Im Bereich zwischen 140 und 150 h kam es bei beiden Messwerten zu größeren Schwankungen. In dieser Zeitspanne fiel die zweite Kammer des Bioreaktorsystems aus und musste abgebaut werden. Dadurch kam es zu einer kurzfristigen Störung des Gasflusses mit Auswirkungen auf die Druck- und die pH-Regulation. Da ein Ausfall bei einer der zwei Kammern nicht unüblich war, wurde hier ein solches Beispiel beschrieben um die Auswirkungen dieses Ausfalls aufzuzeigen und $n=6$ zu repräsentieren.

3.2.4 Verlauf der O_2 -Werte

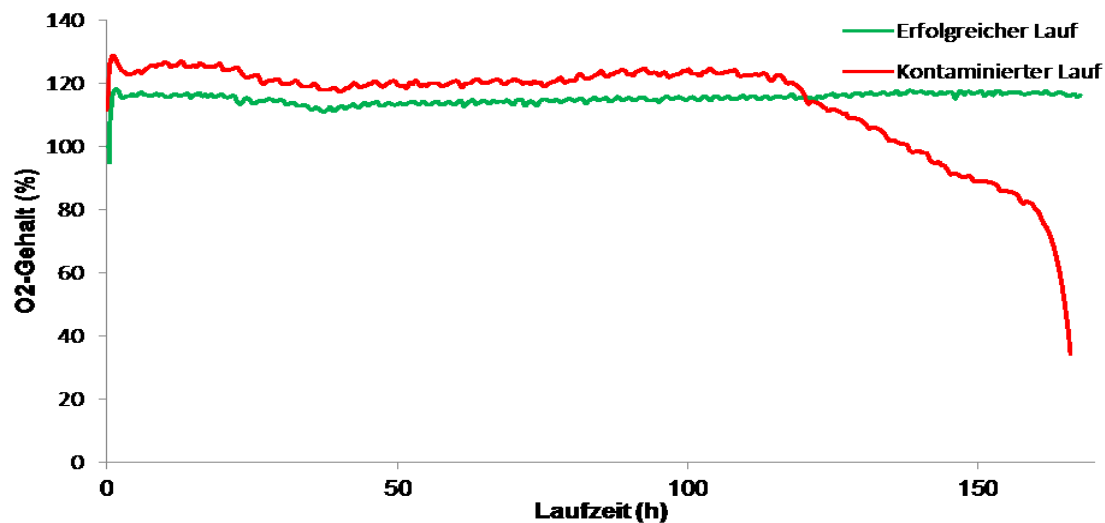


Abb. 16 O_2 -Gehalt im Bioreaktorsystem. Die O_2 -Werte (%) wurden gegen die Laufzeit aufgetragen. Dargestellt sind die Messwerte eines erfolgreichen (grüne Linie) und eines kontaminierten Laufs (rote Linie). Der hier dargestellte durchschnittliche Sauerstoffgehalt lag bei 115 %. Der Sauerstoffgehalt unterschied sich geringfügig bei jedem Lauf wie bei dem hier dargestellten kontaminierten Lauf bis zum Zeitpunkt der Kontamination zu erkennen ist. Hier lag der Durchschnittswert bis zum Auftreten der Kontamination bei 122 %.

Über den gesamten Verlauf konnte ein konstanter Sauerstoffgehalt im BR System gemessen werden. Schwankungen waren in allen erfolgreichen Versuchen nahezu gänzlich abwesend ($n=6$; repräsentative Kurve in Abb. 16, grüne Linie). In Abb. 16 steht der Kurve des Sauerstoffgehaltes des exemplarisch erfolgreichen Laufes (Abb. 16, grüne Linie) diejenige Kurve eines kontaminierten Laufes (Abb. 16, rote Linie) gegenüber. Dabei konnte ein Abfallen des Sauerstoffgehalts bei Kontamination beobachtet werden (Abb.16, rote Linie). Dieser Abfall begann bereits bevor eine Kontamination sichtbar wurde. Zusätzlich war zu beobachten, dass der Startwert des Sauerstoffgehalts bei jedem Lauf geringfügig anders war. In Abb. 16 ist dies repräsentativ anhand des erfolgreichen (Abb. 16, grüne Linie; Durchschnittswert 115 %) und des kontaminierten Laufs (Abb. 16, rote Linie; Durchschnittswert bis zum Zeitpunkt der Kontamination 122 %) zu erkennen.

3.3 Untersuchungsergebnisse der kultivierten Aortenklappentaschen

Zur Untersuchung der Biokompatibilität wurden HE-, Movat-Pentachrom- und Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigt. In einem weiteren Schritt wurden ein Kalzium Assay und von Kossa-Färbungen durchgeführt, um festzustellen, ob es zu einer experimentell bedingten degenerativen Kalzifizierung gekommen war.

3.3.1 Makroskopische Ergebnisse



Abb. 17 Makroskopische Ansicht der Aortenklappentaschen. Die hier dargestellten Klappentaschen stehen exemplarisch für alle nativen und kultivierten Aortenklappentaschen. **A:** Native Aortenklappentasche (Nativ), repräsentativ für n=6 **B:** Aortenklappentasche 7 Tage in Kontrollmedium kultiviert (Ktrl.), repräsentativ für n=3 **C:** Aortenklappentasche 7 Tage in kalzifizierendem Medium kultiviert (Kalzi.), repräsentativ für n=3.

Nach Beendigung eines Bioreaktorlaufes wurden die Aortenklappenbasen makroskopisch auf Strukturunterschiede untersucht und dabei insbesondere die Aortenklappentaschen begutachtet. Durch das Trennen des Gewebes an der Kommissur zwischen zwei Taschenklappen, erhielt man einen uneingeschränkten Einblick auf die Aortenklappentaschen. Die Unterschiede zwischen den kultivierten und den nativen Aortenklappentaschen waren bereits makroskopisch erkennbar. Die nativen Taschenklappentaschen zeigten sich dünn und dezent transparent (Abb. 17 A). Im Gegensatz dazu erschienen die Taschen der kultivierten Aortenklappentaschen verkürzt und verdickt. Ebenso war die Transparenz nicht mehr gegeben (Abb. 17 B & C).

Es wurden native Aortenklappentaschen (n=6) mit kultivierten Klappentaschen (jeweils n=3 von der Kontrollgruppe und von der kalzifizierten Gruppe) verglichen.

3.3.2 Histologische Darstellungen

3.3.2.1 HE-Färbung

In einem ersten Schritt sollte mittels der HE-Färbung eine Strukturübersicht gewonnen, und die Biokompatibilität des Bioreaktors untersucht werden.

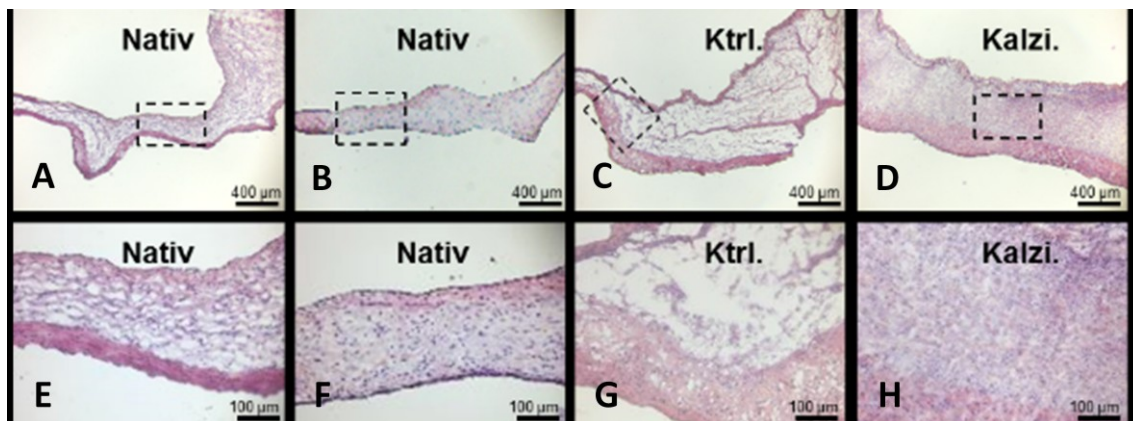


Abb. 18 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Aortenklappentaschen. Hämatoxylin-Eosin-Färbung von nativen (Nativ; A, B, C und D) und unter Kontroll- (Ktrl.; C und G) und prokalzifizierenden (Kalzi.; D und H) Bedingungen im Bioreaktor kultivierten Taschen. Die Abbildungen A/E und B/F stellen Strukturunterschiede der Lamina spongiosa bei ovinen Aortenklappen dar. Zellkerne sind blau, während zytoplasmatische Proteine rot angefärbt sind. Die Rechtecke in der ersten Bildzeile zeigen die Bereiche, die in der zweiten Bildzeile vergrößert dargestellt sind. Die hier dargestellten Ergebnisse stehen repräsentativ für n=6 bei den nativen und für jeweils n=3 bei den kultivierten Klappen.

Die HE-Färbung wurde im Abschnitt 2.3.4.2 beschrieben. In diesem Verfahren färbt Hämatoxylin die DNA, die Zellkerne und die Ribosomen blau an, während Eosin das Zytoplasma, die Mitochondrien und das Kollagen rot anfärbt. Je nachdem wie hoch der Gehalt der jeweiligen Strukturen ist, ist die Farbintensität stärker oder schwächer ausgeprägt. Üblicherweise wird eine höhere Zelldichte in der Lamina fibrosa und in der Lamina ventricularis erwartet, als in der zellärmeren Lamina spongiosa. Es wurden native Aortenklappentaschen (n=6) mit kultivierten Klappentaschen (jeweils n=3 von der Kontrollgruppe und von der kalzifizierten Gruppe) verglichen.

In der HE-Färbung ist die dreischichtige histologische Struktur der Aortenklappentaschen im Ansatz erkennbar (Abb. 18). Die Lamina fibrosa ist hier als breites zelldichtes Band zu erkennen, während die Lamina spongiosa eine lockere-

re Struktur zeigt. Die Lamina ventricularis ist als dünneres zellärmeres Band erkennbar. Die Zellkerne sind blau gefärbt. Es war festzustellen, dass die Beschaffenheit der Lamina spongiosa der nativen Aortenklappentaschen (n=6) je nach Präparat unterschiedlich war. In manchen erschien diese locker und zellarm (Abb. 18 A & E), in anderen dichter und zellreicher (Abb. 18 B & F). Im Vergleich mit Aortenklappentaschen nach Bioreaktorkultivierung (je n=3) zeigt sich kein Unterschied im histologischen Aufbau. Somit entsprechen die Versuchsgruppen dem üblichen Bild von Aortenklappentaschen.

3.3.2.2 Movat-Pentachrom-Färbung

In einem weiteren Schritt sollten die Ergebnisse der HE-Färbung durch eine Movat-Pentachrom-Färbung bestätigt und tiefergehend untersucht werden, da diese Färbung die Gewebestruktur detaillierter wiedergibt.

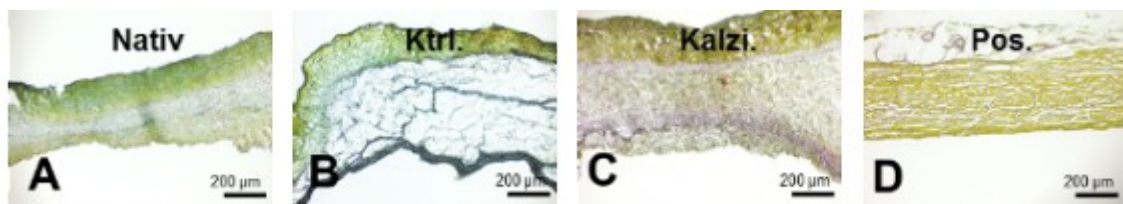


Abb. 19 Movat-Pentachrom-Färbung der Aortenklappen. Movat-Pentachrom-Färbung von nativen (Nativ; A) und unter Kontroll- (Ktrl.; B) und prokalzifizierenden (Kalzi.; C) Bedingungen im Bioreaktor kultivierten Segeln sowie eines chemisch fixierten Perikards (bovines Perikardpatch der Firma Edwards Lifesciences) als Positivkontrolle der Safranfärbung (Pos.; D). Blau dargestellt ist die Grundsubstanz, gelb dargestellt sind Kollagenfasern und violett-schwarz gefärbt sind elastische Fasern sowie Zellkerne. Die hier dargestellten Ergebnisse stehen repräsentativ für n=6 bei den nativen und für jeweils n=3 bei den kultivierten Klappen.

Der Ablauf der Färbung wurde im Abschnitt 2.3.4.3 beschrieben. Diese Färbung besteht aus verschiedenen kombinierten Färbungen: Alcianblau-, Verhoeff-Hämtoxylin, Brilliant-Crocein-Säurefuchsin- und Safranfärbung. Die Alcianblaufärbung färbt die Grundsubstanz des Gewebes und Glycosaminoglycane blaugrün, während die Verhoeff-Hämtoxylin-Färbung die elastischen Fasern und die Zellkerne schwarzviolett färbt. Durch die Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Färbung wird muskuläres Gewebe rot gefärbt, während die Safranfärbung Kollagen gelb anfärbt.

Aufgrund der unterschiedlichen EZM-Zusammensetzung der drei verschiedenen Schichten der Aortenklappentaschen werden diese unterschiedlich angefärbt. Die Lamina fibrosa stellt sich üblicherweise gelblich dar. Dies steht für einen hohen Anteil an kollagenem Bindegewebe. Die Lamina spongiosa wird normalerweise blaugrün angefärbt, da sie viel Grundsubstanz enthält, die vor allem aus Glykosaminoglykane besteht. Aufgrund des erhöhten Gehalts an elastischen Fasern wird die Lamina ventricularis gelb und schwarzviolett dargestellt. Auch in dieser Färbung wurden native Aortenklappentaschen (n=6) mit kultivierten Klappentaschen (jeweils n=3) verglichen.

Aufgrund der farblich größeren Differenz kann die dreischichtige Struktur der Aortenklappentaschen in der Movat-Pentachrom-Färbung im Gegensatz zur HE-Färbung (Abb. 18) deutlicher erkannt werden (Abb. 19 A-C).

Die Gelbfärbung wirkte in Vorversuchen im Vergleich zu anderen Färbungen schwächer, wodurch Bereiche mit Gelb und Blaufärbung grünlich erschienen. Daher dienten Proben von chemisch fixiertem Perikard, (bovines Perikardpatch der Firma Edwards Lifesciences) die äußerst kollagenreich sind, als Kontrolle für die Safranfärbung. Die hier verwendete Positivkontrolle zeigte eine Gelbfärbung, somit war die Safranfärbung erfolgreich (Abb. 19 D).

Die Lamina spongiosa zeigt in der Movat-Pentachrom-Färbung eine lockerere Struktur, die blau angefärbt ist. Auch hier zeigten sich innerhalb der Versuchsgruppen zellärmere und zellreichere Laminae spongiosae wie sie schon in der HE-Färbung ersichtlich waren (Abb. 18 A/E und B/F).

Die Lamina ventricularis ist in dieser Färbung violett-schwarz mit gelblichen Anteilen dargestellt und spiegelt den hohen Elastingehalt wieder. Im Vergleich innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen fiel auf, dass eine gewisse Heterogenität der Färbeintensität innerhalb einer Färbung auftrat. Vor allem die elastischen Fasern waren unterschiedlich stark vertreten. Die Zellkerne sind blauschwarz dargestellt und unterscheiden sich nicht im Vergleich der Versuchsgruppen.

Die Dreischichtigkeit ist somit in allen Versuchsgruppen gegeben.

3.3.2.3 Immunfluoreszenz-Färbung auf Vimentin & vWF

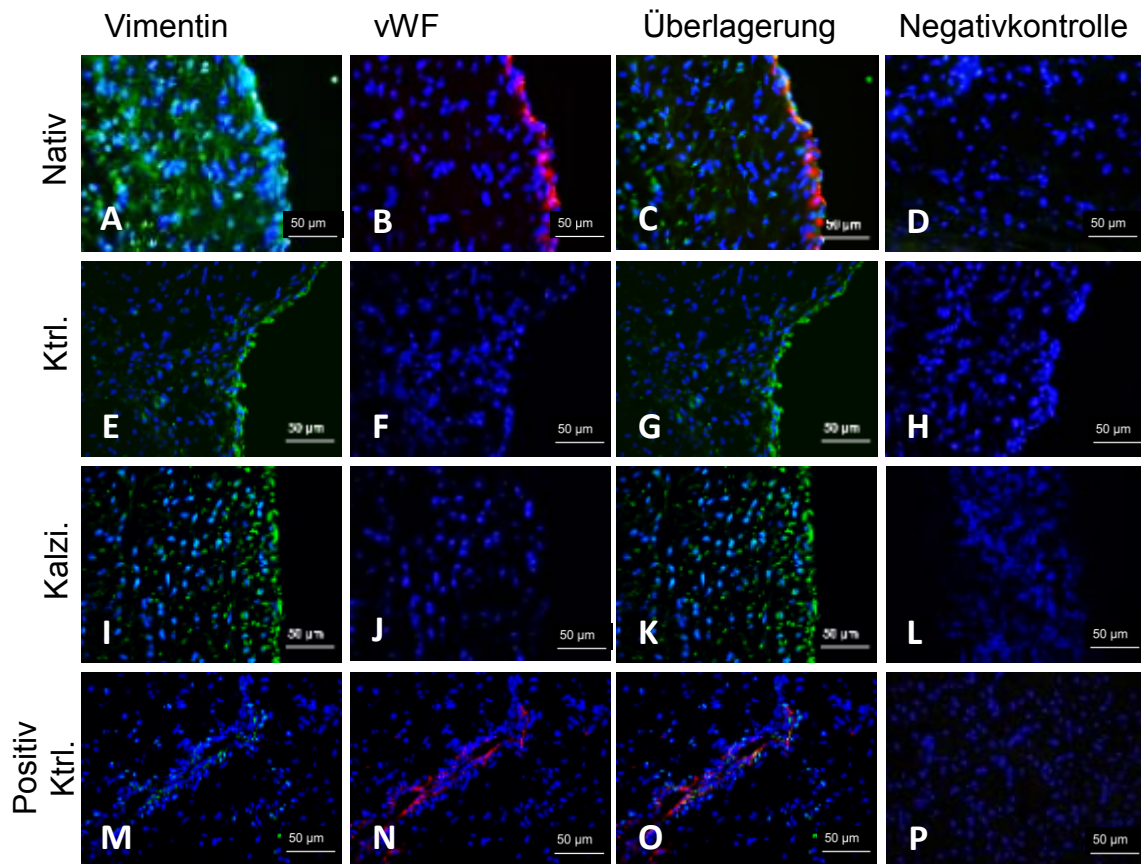


Abb. 20 Immunfluoreszenz-Färbung (Vimentin & vWF) der Aortenklappentaschen. Immunfluoreszenz-Färbung von Vimentin (Marker für Endothel und VICs; grün) und vWF (Endothelzellmarker; rot) und DAPI (Zellkerne, blau) von nativen (Nativ; A-D) und unter Kontroll- (Ktrl.; E-H) und prokalzifizierenden (Kalzi.; I-L) Bedingungen im Bioreaktor kultivierten Taschen sowie von Myokard als Positivkontrolle (Positiv Ktrl., M-P). Dargestellt sind die Einzelkanäle von Vimentin (A, E, I, M) und vWF (B, F, J, N) zusammen mit DAPI sowie ein Bild mit allen drei Kanälen (Überlagerung; C, G, K, O). Des Weiteren sind die Negativkontrollen dargestellt (D, H, L, P). Negativkontrollen sind Proben, die nicht mit dem Primärantikörper behandelt wurden und daher eine unspezifische Färbung ausschließen sollen. Die hier dargestellten Ergebnisse stehen repräsentativ für n=6 bei den nativen und für jeweils n=3 bei den kultivierten Klappen.

Mittels der Immunfluoreszenz-Färbung von Vimentin (Vorkommen in Endothel und VIC's) und vWF (Endothelzellmarker) sollte der Erhaltungszustand des Endothels und der VIC's in den Aortenklappentaschen untersucht werden. Die Färbung wurde in Abschnitt 2.3.4.4 beschrieben und sollte abschließend eine weitere Komponente der Biokompatibilität untersuchen.

Es wurden native (n=6) und kultivierte Aortenklappentaschen (n=3 je Bedingung) verglichen. Jedes Präparat lag zweifach vor. Dabei war eines das zu un-

tersuchende Präparat, während das andere als Negativkontrolle (Abb. 20 D, H, L & P) mitgeführt wurde. Die Negativkontrolle wurde nicht mit dem Primärantikörper behandelt, um eine unspezifische Färbung auszuschließen. Zusätzlich wurde ein Myokardpräparat als Positivkontrolle mitgeführt (Abb. 20 M-P), da es Gefäße aufweist, deren Endothel sowohl Vimentin als auch vWF positiv ist.

Bei den kultivierten Aortenklappentaschen sind die VIC's in ähnlicher Ausprägung wie bei den nativen Klappentaschen zu finden (Abb. 20 A, E & I). Unterschiede konnte man beim Erhalt des Endothels erkennen. Die durchgängige Endothelschicht der nativen Klappentaschen (Abb. 20 B, rot) war in den kultivierten Klappentaschen nicht mehr zu erkennen (Abb. 20 F & J). Die Zellkerne sind sowohl in den nativen Aortenklappentaschen (Abb. 20 A-C), als auch in den kultivierten Klappentaschen ersichtlich (Abb. 20 E-G, I-K). Die Positivkontrolle (Myokard) weist die spezifische Färbung auf Vimentin und vWF, sowie die Zellkerne auf (Abb. 20 M-P). Die zu jedem Präparat erfolgte Negativkontrolle zeigte eine blaue Färbung der Zellkerne und keine Färbungen im rot- oder grün-Kanal (Abb. 20 D, H, L & P). In der Darstellung der Immunfluoreszenz-Färbung wird deutlich, dass zwar das äußere Endothel während der Kultivierung verloren geht, die VIC's und die Struktur der Aortenklappentaschen allerdings erhalten bleiben.

3.3.2.4 Von-Kossa-Färbung

Zur Untersuchung der artifiziellen Kalzifizierung wurden von-Kossa-Färbungen durchgeführt wie in Abschnitt 2.3.4.5 beschrieben. Dabei werden Kalzifizierungen schwarz angefärbt, während Zellkerne mithilfe von Kernechtrot rot angefärbt werden. Hierbei wurden native (n=6) und kultivierte Aortenklappentaschen (jeweils n=3 von der Kontrollgruppe und von der kalzifizierten Gruppe) verglichen. Zusätzlich wurde eine verkalkte Aorta als Positivkontrolle mitgeführt (Abb. 21 D & H), um eine erfolgreiche Färbung zu verifizieren.

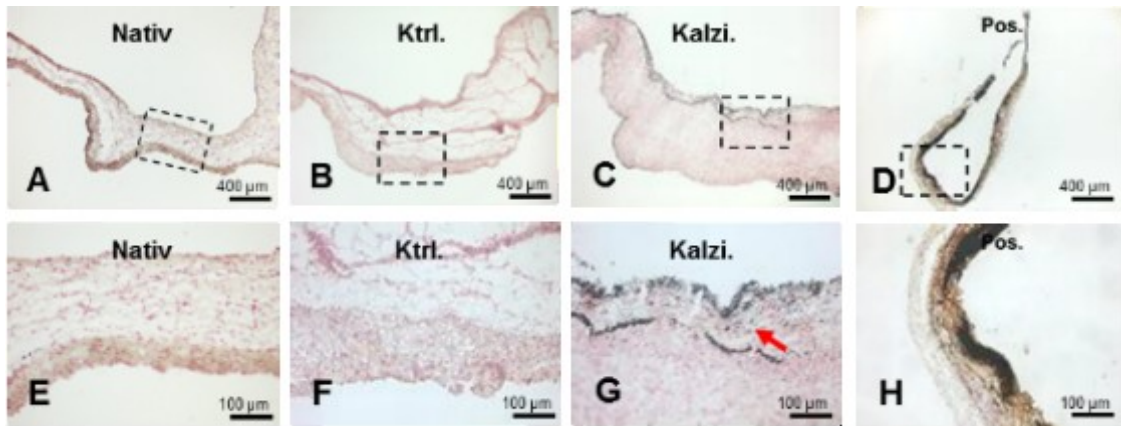


Abb. 21 Von-Kossa-Färbung der Aortenklappen Von-Kossa-Färbung von nativen (Nativ; A und E) und unter Kontroll- (Ktrl.; B und F) oder prokalzifizierenden (Kalzi.; C und G) Bedingungen im Bioreaktor kultivierten Aortenklappen sowie einer verkalkten Aorta als Positivkontrolle (Pos.; D und H). Die schwarze Färbung zeigt dabei die Kalzifizierung an, während Zellkerne rot gefärbt sind. Rechtecke in der ersten Bildzeile zeigen Stellen die in der zweiten Bildzeile vergrößert dargestellt sind. Der rote Pfeil (G) verweist auf eine tiefergehende Kalzifizierung. Die hier dargestellten Ergebnisse stehen repräsentativ für n=6 bei den nativen und für jeweils n=3 bei den kultivierten Klappen.

Die nativen Klappentaschen und die im Kontrollmedium kultivierten Klappentaschen wiesen keine Kalzifizierungen auf (Abb. 21 A, B, E & F). Bereits in der Übersichtsaufnahme der kalzifizierten Gruppe sind deutliche oberflächliche Kalzifizierungen sowohl auf der ventrikulären, als auch der aortalen Seite zu erkennen (Abb. 21 C). In einer höheren Vergrößerung zeigten sich auch Kalzifizierungen, die sich tiefergehend befanden (Abb. 21 G, roter Pfeil). Diese waren vor allem in obersten Schichten der Lamina ventricularis und Lamina fibrosa ersichtlich. Ein höherer Anteil der Kalzifizierungen fand sich dabei in der Lamina ventricularis. Die mitgeführte Positivkontrolle (verkalkte Aorta) zeigte eine Kalzifizierung (Abb. 21 D & H).

Anhand der von-Kossa-Färbung können in den Proben, die im kalzifizierenden Medium kultiviert wurden, Kalzifizierungen nachgewiesen werden. Bei den nativen Aortenklappentaschen und der Kontrollgruppe konnten Kalzifizierungen nicht nachgewiesen werden.

3.3.3 Kalzium Assay

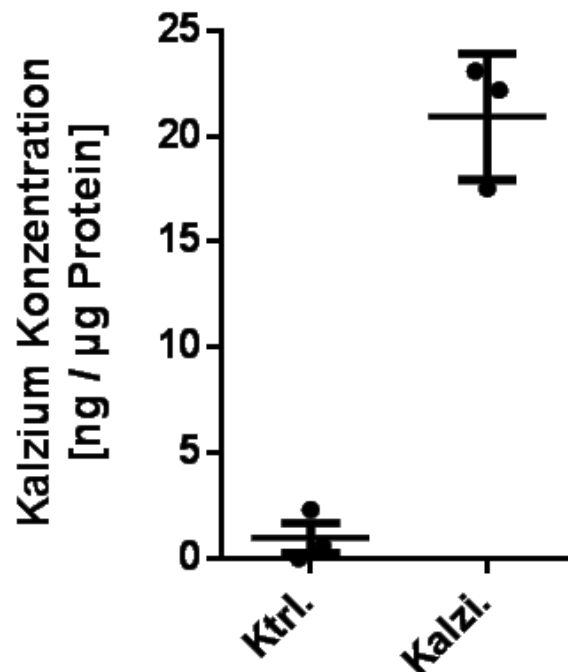


Abb. 22 Quantitative Bestimmung des Kalziumgehalts in kultivierten Aortenklappentaschen. Dargestellt ist die *Ex Vivo* Induktion der Biomineralisation im BR. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für die unter Kontroll- (Ktrl.; 0,98 +/- 1,201 ng/µg) oder prokalzifizierenden (Kalzi.; 20,94 +/- 2,984 ng/µg) Bedingungen im Bioreaktor kultivierten Aortenklappen. Bei quantitativem Nachweis von Kalziumgehalt in Aortenklappentaschen zeigte sich ein deutlicher Anstieg in den Klappen, die unter prokalzifizierenden Bedingungen im BR kultiviert wurden, gegenüber den unter Kontrollbedingungen kultivierten Klappentaschen ($p = 0,10$; Mann-Whitney-U-Test). Die hier dargestellten Ergebnisse stehen für jeweils $n=3$ bei den kultivierten Klappen.

Beim quantitativem Nachweis des Kalziumgehaltes in den Aortenklappentaschen zeigte sich ein deutlicher Anstieg ($p = 0,10$; Mann-Whitney-U-Test) in den Klappen, die unter prokalzifizierenden Bedingungen im BR kultiviert wurden (Kalzi.; 20,94 +/- 2,984 ng/µg) gegenüber den unter Kontrollbedingungen kultivierten Klappentaschen (Ktrl.; 0,98 +/- 1,201 ng/µg). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für jeweils $n=3$ (Abb. 21).

4. **DISKUSSION**

Vor dem Hintergrund der steigenden Bedeutung der AKS, deren Ursachen noch nicht vollständig geklärt sind, ist ein anhaltend großer Bedarf für kliniknahe Modelle der Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen und geeigneter Therapieansätze vorhanden. In dieser Arbeit konnte ein vollautomatisierter, computergesteuerter Bioreaktor zur artifiziellen Kalzifizierung von ovinen Aortenklappentaschen etabliert werden. Für die Untersuchung dieser Erkrankung sind valide Studienmodelle essentiell wie beispielsweise das hier vorgestellte Bioreaktormodell.

Nach der initialen Optimierung dieses Modells wurde die Kultivierung von Aortenklappentaschen durchgeführt (s. Abschnitt 2.3.3). Dies geschah über sieben Tage mittels eines pulsatilen Durchflusses von kalzifizierendem Kulturmedium unter physiologischen Bedingungen und es konnte die Biokompatibilität mittels histochemischer und Immunfluoreszenz-basierter Färbung bestätigt werden. Mittels näherer histochemischer Untersuchung und eines quantitativen kolorimetrischen Assay konnte schließlich eine erfolgreiche Induktion degenerativer Kalzifizierung in nativen Aortenklappentaschen gezeigt werden. In den folgenden Abschnitten werden die gewonnenen Ergebnisse und die mögliche zukünftige Relevanz dieses Bioreaktorsystems diskutiert.

4.1 **Beurteilung der Optimierungen und des Versuchsablaufs**

Wie bereits in Abschnitt 1.2 erwähnt bieten Bioreaktoren als *ex vivo* Modelle diverse Vorteile gegenüber *in vivo* und *in vitro* Studien. Nicht nur lassen sich die für Entstehung pathologischer Veränderungen maßgeblichen Kofaktoren beeinflussen, diese Modelle stellen vielmehr eine physiologischere Situation dar als die bislang häufig eingesetzten *in vitro* Modelle [80, 81]. Solche Kofaktoren sind beispielsweise Zustände bei Hypertonie oder Hypoxie, die im klinischen Setting als Risikofaktoren der AKS gesehen werden [20, 33-36]. Im Vergleich sind die alternativ zu wählenden *In vivo* Studien meist kostenintensiv und erfordern eine umfangreiche und langwierige Tierhaltung und -aufzucht bei physiologischen Großtiermodellen. Als Kompromiss wird oft auf Kleintiermodelle zurückgegrif-

fen, die jedoch anatomische und teilweise auch auf Organebene histologische Unterschiede zum Menschen aufweisen [83]. Diese Probleme können teilweise bei *ex vivo* Modellen beseitigt werden.

Das hier vorgestellte Bioreaktorsystem wurde auf Grundlage der Dissertationsarbeit von Stefanie Aubin (geb. Hoffmann) in Hinsicht auf die hier untersuchte Fragestellung optimiert [88]. In ihrer Arbeit konnte sie mithilfe des Bioreaktors ovine dezellularisierte Pulmonalklappen vollständig mit Endothelzellen rebesiedeln.

Als Ausgangspunkt der AKS werden Scherkräfte angenommen [88]. Dieser Annahme folgend wurde das hier vorgestellte Bioreaktormodell entwickelt. Unter einem pulsatilen Strömungsprofil konnte eine physiologische Situation nachgebildet werden. Die Anforderung eines pulsatilen Strömungsprofils stellte eine Neuerung gegenüber bisherigen Modellen dar. In den Studien von Sun et al. wurde eine pulsatile Wellenform angewendet, wobei eine Besonderheit die seitenspezifische Belastung war [68, 87, 89]. In den Modellen von Balachandran et al. wurde zusätzlich zu einem wellenförmigen Durchfluss eine zyklische Streckung und Dehnung durchgeführt [68, 87, 89].

In der hier vorgestellten Arbeit wurde der pH automatisch über die Begasung reguliert. In den Arbeiten von Sun et al. und Balachandran et al. wurde lediglich ein konstanter Wert von 5% CO₂ in einem Inkubator aufrechterhalten.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Kultivierungszeit mit sieben Tagen deutlich erhöht im Vergleich zu den meisten Bioreaktorstudien. Diese zuvor beschriebenen Ansätzen beinhalten Kultivierungszeiten zwischen 24 und 96 Stunden [68, 87, 89].

Bevor mit der Untersuchung der Fragestellung begonnen werden konnte, musste zunächst eine Optimierung des Systems erfolgen. Dazu wurden in einem ersten Schritt Fehlerquellen beseitigt. Dazu gehörten Kontaminationen, Schlauchrisse und Leckagen an den Insertionsstellen der Sonden sowie den Glasoliven.

So wurden die Leckagestellen an den Insertionsstellen der Sonden sowie an den Glasoliven bereits nach der ersten Phase behoben. Hierzu wurden diverse

Schläuche zum besseren Abschluss an den Sonden ausgetestet sowie verschiedene Kombinationsmöglichkeiten mit Hilfsmitteln wie Schlauchschellen und Dichtringen.

Zwar traten in der Phase nach den erfolgten Optimierungen noch vereinzelt Schlauchrisse auf, jedoch wurde nach der Optimierungsphase ein weiteres Schlauchmodell getestet, bei dem keine Risse mehr auftraten.

Das größte und langwierigste Problem war die bakterielle Kontamination, welche zu einer vollständigen Unbrauchbarkeit des betroffenen Probenmaterials führte. Eine mögliche Fehlerquelle, die zumindest teilweise für das Auftreten einer Kontamination verantwortlich war, ist in der Technik der Entnahme der Herzen am Schlachthof anzusehen, da diese in der initialen Phase nicht gänzlich steril erfolgte.

Ein weiterer Aspekt waren die zahlreichen Steckverbindungen des Bioreaktorsystems. Diese Steckverbindungen stellten Schwachstellen dar, indem sie als potentielle Eintrittspforte für Keime dienen können. Die Anzahl der Steckverbindungen ließ sich jedoch nicht weiter reduzieren, weil diese für einen Austausch der Verbrauchsmaterialien und den Übergang zwischen Schläuchen unterschiedlicher Dicke notwendig waren. Außerdem war dieser Aufbau für das sterile Einnähen der Klappentaschen in den Bioreaktor essentiell (s. Abschnitt 2.2, Abb. 2 B und Abschnitt 2.3.1, Abb. 7 B). Durch die Steckverbindung, die sich direkt an der Bioreaktorkammer befindet, konnte der innere Kammerbereich vom restlichen Bioreaktorsystem separiert werden. Dadurch wurde das Einnähen der Klappentaschen deutlich erleichtert und neben der leichteren Handhabung konnte auch das Kontaminationsrisiko gesenkt werden. Durch regelmäßige visuelle Kontrollen auf Leckagen dieser Verbindungsstellen und den sorgfältigen Zusammenbau unter sterilen Bedingungen wurde das Risiko deutlich reduziert.

Mithilfe der oben beschriebenen Optimierungen konnte die Erfolgsrate verdreifacht werden und die Fehlerquellen weitestgehend beseitigt werden. Trotz Optimierungen und einem intensiven Reinigungsprotokoll konnten Kontaminatio-

nen nicht vollständig vermieden werden, sodass hier noch Bedarf an weiterer Verbesserung im Rahmen zukünftiger Studien besteht.

Für eine erfolgreiche Kultivierung musste passendes Spendergewebe und ein dazu passendes Kulturmedium mit entsprechenden Zusätzen gewählt werden. Die Kultivierung der Aortenklappentaschen erfolgte in einem Standardmedium (DMEM) versetzt mit 10% FCS, Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration Penicillin 200 U/ml und Streptomycin 200 µg/ml), Amphotericin B (Endkonzentration 5 µg/ml) und 1% nicht-essentielle Aminosäuren (s. Abschnitt 2.3.3). Vor allem FCS und nicht-essentielle Aminosäuren dienten hierbei als Nährstoffe für die Zellen der Aortenklappentaschen und sicherten das Überleben des Gewebes. Da das hier eingesetzte System nicht über ein Abwehrsystem vergleichbar mit dem Immunsystem eines intakten Organismus verfügt, ist der Einsatz von Antibiotika und eines Antimykotikum unerlässlich [84, 90, 91]. Diese hier eingesetzte Zusammensetzung war bereits eine etablierte Methode in der Arbeitsgruppe und wurde in den Vorversuchen bestätigt. Für das kalzifizierende Medium wurden diesem Kontrollmedium zusätzlich β -GP und Kalziumchlorid zugesetzt, wobei die mineralisierende Wirkung von β -GP bereits in früheren Arbeiten beobachtet wurde, ebenso wie die von Kalziumchlorid [92, 93]. Auch diese Konstellation wurde bereits innerhalb der Arbeitsgruppe erfolgreich verwendet.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden Aortenklappentaschen von Lämmern als Spendergewebe verwendet (s. Abschnitt 2.3.1, Abb. 7). Bisherige Bioreaktormodelle verwendeten Stanzen aus porkinen Aortenklappentaschen [68, 87, 89]. Ovine Modelle kommen der Physiologie des Menschen sehr nahe und in der kardiovaskulären Forschung wird daher regelmäßig auf sie zurückgegriffen [82]. Weitere Auswahlkriterien waren die kostengünstige und problemlose Beschaffung des Spendergewebes sowie die optimalen Größenverhältnisse für das Vernähen im Bioreaktor (s. Abschnitt 2.3.1, Abb. 7 B). Die Verwendung dieses Spendergewebes wurde in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich etabliert.

Eine weitere Anforderung an den Bioreaktor war dessen Autonomie in der Aufrechterhaltung der physiologischen Parameter. Diese Parameter orientierten

sich an den physiologischen Bedingungen, die an der menschlichen Aortenklappe herrschen (s. Abschnitt 2.3.3). Zur Validierung wurden die Parameter kontinuierlich aufgezeichnet. Anhand der Verlaufsdiagramme (s. Abschnitt 3.2, Abb. 10-15) konnte diese Anforderung bewiesen werden. Die Sollwerte von pH, Temperatur, Druck und Durchflussgeschwindigkeit konnten über die gesamte Dauer einer Kultivierung aufrechterhalten bleiben. So konnten für jede Kultivierung unabhängig von äußeren Umwelteinflüssen gleiche Bedingungen garantiert werden.

Zusätzlich wurde eine weitere Kontrollinstanz der Kontamination etabliert. Anhand der Aufzeichnung des Sauerstoffgehalts konnte eine Kontamination erkannt werden, bevor sie visuell erkennbar wurde. Im Vergleich zu einem erfolgreichen Lauf fiel der O₂-Wert bei einer Kontamination rapide ab (s. Abschnitt 3.2, Abb. 16). Außerdem fiel auf, dass sich die Startwerte des Sauerstoffgehalts unter den Kultivierungen unterschieden. Der unterschiedliche Sauerstoffverbrauch könnte durch die unterschiedlichen Größen der Aortenklappenbasen zustande gekommen sein, z.B. durch unterschiedliche Dicken des Myokardrings.

Dementsprechend konnte der Bioreaktor als ein vollautomatisiertes und computergesteuertes System etabliert werden, dass zwar noch Probleme mit bakterieller Kontamination aufweist, aber darüber hinaus fehlerfrei arbeitet. Mithilfe dieses Bioreaktors konnte eine physiologische Simulation der Situation an den menschlichen Aortenklappen erreicht werden.

4.2 Beurteilung der Biokompatibilität

Um die Biokompatibilität des Bioreaktors sicherzustellen, wurden histologische und immunhistochemische Färbungen durchgeführt. In der HE- und Movat-Pentachrom-Färbung waren im Vergleich zwischen kultivierten und nativen Aortenklappentaschen keine Unterschiede zu erkennen. Wie auch in anderen, zuvor publizierten Untersuchungen mit Einsatz eines Bioreaktorsystems konnten hier keine sichtbaren Gewebestrukturänderungen erkannt werden [84, 87, 89].

Die dreischichtige Struktur, die Zelldichte und die Zellkerne blieben erhalten. Somit konnte die physiologische Struktur der Aortenklappentaschen auch nach Kultivierung bewahrt werden.

Außerdem zeigte sich im Vergleich der nativen Klappentaschen, dass sowohl eine zellarme als auch eine zellreiche Lamina spongiosa auftreten konnte. Da dies innerhalb einer Färbung bei allen Versuchsgruppen auftrat, liegt die Vermutung nahe, dass die Heterogenität auf die Versuchstiere zurückzuführen und somit physiologisch ist. Eine andere Erklärung wäre ein unterschiedlicher Elastingehalt in bestimmten Bereichen der Aortenklappentasche, sprich mehr Elastin in den Randbereichen der Taschenklappe und ein geringerer Elastinanteil in der Mitte der Taschenklappe. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen bereits Tseng et al. [94]. Bei der Untersuchung des Elastingehaltes in der Lamina spongiosa wurde in der Studie von Tseng et al. festgestellt, dass sich der Elastingehalt und dessen Ausrichtung in den verschiedenen Bereichen der Aortenklappentasche unterscheidet. In der hier vorgestellten Arbeit haben wir nicht zwischen den unterschiedlichen Bereichen unterschieden, daher ist es möglich, dass die unterschiedlichen Ergebnisse in Hinblick auf die Zelldichte, durch unterschiedlich angeschnittene Bereiche zustande gekommen sind. Interessant wäre eine tiefergehende Untersuchung dieses Sachverhalts.

In der aktuellen Literatur finden sich unterschiedliche Kollagengehalte der Lamina fibrosa. Diese reichen von einem niedrigen (grünstichig gelb angefärbte Lamina fibrosa) bis zu einem hohen Gehalt (rein gelb angefärbte Lamina fibrosa) an Kollagen. In der hier vorgestellten Arbeit ließ sich ein vergleichsweise niedriger Gehalt an Kollagen in der Lamina fibrosa erkennen ähnlich wie in der Arbeit von Hinton et al. in der ebenfalls mit ovinem Material gearbeitet wurde [95]. Eine erfolgreiche Anfärbung der Kollagenstruktur konnte mithilfe der Positivkontrolle (Edward-Patch) sichergestellt werden. Folglich ist Kollagen in den untersuchten Klappen vorhanden, allerdings wird der Kollagengehalt höchstwahrscheinlich von der Grundsubstanz überlagert.

Es stellt sich ebenfalls die Frage, ob sich der Kollagengehalt innerhalb verschiedener Schafsrassen unterscheidet. Gegebenenfalls könnte auch eine genetische Variation von ovinen Individuen zu einem unterschiedlichen Kollagen-

gehalt führen. In weiterführenden Studien könnte dieser Sachverhalt ebenfalls weitergehend untersucht werden.

Der bereits im Rahmen der histologischen Färbungen bestätigte Erhalt der Struktur und der EZM-Zusammensetzung deutet bereits eine Biokompatibilität des Bioreaktors an. Mithilfe einer abschließenden Immunfluoreszenz-Färbung auf Vimentin und vWF sollten nun die relevanten residenten Zelltypen nachgewiesen werden, um deren Erhalt und damit indirekt die Biokompatibilität des angewandten BR-Kultursystems weiter bestätigen zu können. Die VIC's sowie die Zellkerne konnten bewahrt werden und somit kann phänotypisch die native zelluläre Komposition in den kultivierten Aortenklappentaschen bekräftigt werden [7].

Jedoch ging das äußere Endothel nach der Kultivierung der Aortenklappentaschen verloren. In der Studie von Sun et al. konnte das Endothel erhalten werden [68]. Der vermutete Verlust endothelialer Oberfläche kultivierter Aortenklappentaschen könnte durch die Verwendung eines Standardmediums an Stelle eines speziellen Endothelzellmediums erklärt werden. Da in der vorliegenden Arbeit das Bioreaktorsystem optimiert und getestet werden sollte, wurde zunächst ein Standardmedium verwendet, in dem viele Zelltypen kultivierbar sind, einige spezialisierte Zelltypen wie etwa Endothelzellen jedoch hierunter bekanntermaßen eine geringere Überlebensrate aufzeigen. In der Arbeit von Sun et al. wurden Aortenklappen direkt nach der Schlachtung der Spendertiere vor Ort präpariert und als Stenzen in eiskaltem PBS transportiert. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Präparation der Aortenklappenbasen steril im Labor. Die nativen Aortenklappentaschen wiesen jedoch kaum Endothelverlust auf, weshalb der Aspekt des unterschiedlichen Transports vernachlässigbar zu sein scheint. In der aktuellen Literatur wird die Entstehung der AKS mit Endothelschäden verbunden [54]. Da dies unsere Fragestellung nur unterstützte und der Erhalt des Endothels nicht primäres Ziel der Arbeit war, wurde das Medium im Verlauf der Versuche dieser Promotionsarbeit nicht gewechselt. Bei zukünftigen Arbeiten mit einem fokussierten Interesse am Erhalt des Endothels müsste eine entsprechende Anpassung des Kulturmediums erfolgen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die dreischichtige Gewebestruktur sowie die Zellmorphologie nach Kultivierung im BR erhalten bleiben konnten. Zwar war ein Verlust des äußeren Endothels zu verzeichnen, jedoch hatte dies keinen negativen Einfluss auf die Untersuchung der Fragestellung. Aufgrund dieser Resultate kann man davon ausgehen, dass der hier vorgestellte Bioreaktor weitestgehend biokompatibel ist.

4.3 Beurteilung der Kalzifizierung

Im Rahmen dieser Studie erfolgte eine erfolgreiche Induktion degenerativ kalzifizierender Veränderungen in nativen ovinen Aortenklappentaschen mithilfe eines voll automatisierten Bioreaktorsystems. Die Beurteilung der kalzifizierten Aortenklappentaschen erfolgte jeweils vergleichend zu einer im Kontrollmedium kultivierten und einer nativen Aortenklappentasche. Dies geschah sowohl morphologisch anhand einer histochemischen Färbung als auch biochemisch anhand eines quantitativen photometrischen Assays.

Im direkten mikroskopischen Vergleich der nativen mit im Kontrollmedium kultivierten Aortenklappentaschen und den kalzifizierten Aortenklappentaschen konnte eine deutliche oberflächliche Kalzifizierung sowohl auf der ventrikulären als auch auf der aortalen Seite bei den kalzifizierten Aortenklappentaschen beobachtet werden. Zusätzlich sind in den Schichten der Lamina ventricularis und der Lamina fibrosa infiltrative Kalzifizierungen zu erkennen. Durch dieses Ergebnis konnte schlussgefolgert werden, dass die Kalzifizierung nicht nur oberflächlich dem Aortenklappentascengewebe aufgelagert ist, sondern dass vielmehr ein Biomineralisationsprozess stattgefunden hat, bei dem Kalzium auch in das Innere des Gewebes eingebracht wurde. In der hier vorgestellten Arbeit konnten vor allem an der Lamina ventricularis Kalzifizierungen festgestellt werden. In der Arbeit von Balachandran et al. konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Jedoch wurde hier eine stärkere Kalzifizierung der Lamina fibrosa im Vergleich zur Lamina ventricularis festgestellt [89]. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte es an dem pulsatilen Flussprofil liegen, welches eine direkte Belastung der Lamina ventricularis mit sich führt.

Des Weiteren wurden in der Studie von Balachandran et al. porkine Aortenklappen verwendet, was ebenfalls zu einem anderen Ergebnis führen könnte als bei ovinen Aortenklappen. Außerdem wurde in der Arbeit von Balachandran et al. ein anderes Medium verwendet, welches u.a. TGF- β enthielt. Dies könnte ebenfalls zu den Unterschieden geführt haben, da TGF- β eine Reihe von degenerativen Prozessen aktiviert [25, 71, 78, 78, 96]. Inwiefern sich dieses Ergebnis auf die physiologische Nachbildung einer AKS auswirkt, könnte in weiterführenden Studien geklärt werden.

Quantitativ konnte hier bereits mittels der relativ geringen Probenmenge und des begrenzten Stichprobenumfangs eine deutliche Tendenz für eine erhöhte experimentell induzierte Kalzifizierung erkannt werden ($p=0.10$), jedoch war das Ergebnis nicht signifikant. Um eine mögliche Signifikanz erreichen zu können, wäre eine größer angelegte Studie notwendig. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Etablierung lag, wurde eine Gruppengröße von $n=3$ zur Demonstration der grundsätzlichen Machbarkeit der Bioreaktorkultivierung als ausreichend betrachtet.

Zudem führte der reine Scherstress des pulsatilen Strömungsprofils zu keinen signifikanten Kalzifizierungen, was mit den Ergebnissen von Balachandran et al. übereinstimmt, bei denen es lediglich mit der Kombination aus Bioreaktor und kalzifizierendem Medium zu einer Kalzifizierung kam [89].

Zusammenfassend konnte eine Kalzifizierung der ovinen Aortenklappentaschen nach Kultivierung mit kalzifizierendem Medium im Bioreaktor sowohl histologisch als auch biochemisch quantitativ nachgewiesen werden.

Weiterführende Studien, die ihren Fokus beispielsweise auf die Genexpression oder den Proteinhaushalt legen, erscheinen sinnvoll, um andere Aspekte der Bioreaktorkultivierung zu untersuchen. Sie sollten eine größere Stichprobenanzahl umfassen, um signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen genauer zu erfassen. Mithilfe dieses validierten *ex vivo* Modells könnte Ursachenforschung betrieben werden, um die Entstehung der AKS besser zu verstehen. Darunter könnten Studien fallen, die sich mit Kofaktoren der Erkrankung

gen beschäftigen, wie beispielsweise dem Einfluss von Hypoxie oder von Hypertonie. Des Weiteren wäre eine tiefergehende Untersuchung der bislang im Zusammenhang mit AKS als relevant erachteten Signalwege denkbar, z.B. der TGF- β -Signalweg, oder aber auch die Rolle von myofibroblastischen VIC's. Auch die Rolle des anorganischen Phosphats, als Beginn der Kalzifizierung, wäre untersuchungswürdig. Außerdem sind mithilfe dieses Modells Therapie-modelle denkbar. Unterschiedliche Wirkstoffe und Kombinationen könnten so auf ihre Wirksamkeit getestet werden.

5. **LITERATURVERZEICHNIS**

1. Manning WJ (2013) Asymptomatic aortic stenosis in the elderly: A clinical review. JAMA 310(14): 1490–1497. doi: 10.1001/jama.2013.279194
2. Statistisches Bundesamt Diagnosedaten der Krankenhäuser (Eckdaten der vollstationären Patienten und Patientinnen)
3. Statistisches Bundesamt Sterbefälle, Sterbeziffer (altersstandardisiert), häufigste Todesursachen (ab 1998)
4. Schünke M, Schulte E, Schumacher U (2015) Innere Organe, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage. Prometheus, LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke, Erik Schulte, Udo Schumacher ; Illustrationen von Markus Voll, Karl Wesker. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
5. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2015) Histologie, 5., vollständig überarbeitete Auflage
6. Arjunon S, Rathana S, Jo H et al. (2013) Aortic valve: mechanical environment and mechanobiology. Ann Biomed Eng 41(7): 1331–1346. doi: 10.1007/s10439-013-0785-7
7. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI (2007) The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. Am J Pathol 171(5): 1407–1418. doi: 10.2353/ajpath.2007.070251
8. Davies PF, Passerini AG, Simmons CA (2004) Aortic valve: turning over a new leaf(let) in endothelial phenotypic heterogeneity. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(8): 1331–1333. doi: 10.1161/01.ATV.0000130659.89433.c1
9. Brown J, Morgan-Hughes NJ (2005) Aortic stenosis and non-cardiac surgery. Contin Educ Anaesth Crit Care Pain 5(1): 1–4. doi: 10.1093/bjaceaccp/mki001

10. Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS et al. (2012) Rheumatic heart disease. *The Lancet* 379(9819): 953–964. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61171-9
11. Rosenhek R, Binder T, Porenta G et al. (2000) Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med* 343(9): 611–617. doi: 10.1056/NEJM200008313430903
12. Otto CM, Pearlman AS, Gardner CL (1989) Hemodynamic progression of aortic stenosis in adults assessed by doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 13(3): 545–550. doi: 10.1016/0735-1097(89)90590-1
13. Davies SW, Gershlick AH, Balcon R (1991) Progression of valvar aortic stenosis: a long-term retrospective study. *Eur Heart J* 12(1): 10–14
14. Camm AJ, Lüscher TF, Serruys PW (2009) *The ESC textbook of cardiovascular medicine*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, New York
15. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO et al. (2014) 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 129(23): 2440–2492. doi: 10.1161/CIR.0000000000000029
16. Otto CM, Burwash IG, Legget ME et al. (1997) Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome. *Circulation* 95(9): 2262–2270
17. Otto CM (2008) Calcific aortic stenosis--time to look more closely at the valve. *N Engl J Med* 359(13): 1395–1398. doi: 10.1056/NEJMe0807001
18. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F et al. (2012) Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). *Eur Heart J* 33(19): 2451–2496. doi: 10.1093/eurheartj/ehs109

19. Chu Y, Lund DD, Weiss RM et al. (2013) Pioglitazone attenuates valvular calcification induced by hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(3): 523–532. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300794
20. Elmariah S, Delaney JAC, O'Brien KD et al. (2010) Bisphosphonate Use and Prevalence of Valvular and Vascular Calcification in Women MESA (The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol* 56(21): 1752–1759. doi: 10.1016/j.jacc.2010.05.050
21. Yontar OC, Yilmaz MB (2008) Importance of serum high-density lipoprotein levels to aortic valvular disease. *Br J Pharmacol* 155(8): 1163. doi: 10.1038/bjp.2008.348
22. Speidl WS, Cimmino G, Ibanez B et al. (2010) Recombinant apolipoprotein A-I Milano rapidly reverses aortic valve stenosis and decreases leaflet inflammation in an experimental rabbit model. *Eur Heart J* 31(16): 2049–2057. doi: 10.1093/eurheartj/ehq064
23. Trapeaux J, Busseuil D, Shi Y et al. (2013) Improvement of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic therapy is associated with decreased aortic root and valve remodelling in mice. *Br J Pharmacol* 169(7): 1587–1599. doi: 10.1111/bph.12236
24. Lommi JI, Kovanen PT, Jauhiainen M et al. (2011) High-density lipoproteins (HDL) are present in stenotic aortic valves and may interfere with the mechanisms of valvular calcification. *Atherosclerosis* 219(2): 538–544. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.08.027
25. Aikawa E, Aikawa M, Libby P et al. (2009) Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation* 119(13): 1785–1794. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827972
26. Ziemer G, Haverich A (2010) *Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und den herznahen Gefäßen*, 3., völlig neu bearb. Aufl. Springer, Berlin

27. Beckmann A, Funkat A-K, Lewandowski J et al. (2017) German Heart Surgery Report 2016: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 65(7): 505–518. doi: 10.1055/s-0037-1606603
28. Bach DS (2011) Prevalence and characteristics of unoperated patients with severe aortic stenosis. *J Heart Valve Dis* 20(3): 284–291
29. Iung B, Cachier A, Baron G et al. (2005) Decision-making in elderly patients with severe aortic stenosis: why are so many denied surgery? *Eur Heart J* 26(24): 2714–2720. doi: 10.1093/eurheartj/ehi471
30. Varadarajan P, Kapoor N, Bansal RC et al. (2006) Clinical profile and natural history of 453 nonsurgically managed patients with severe aortic stenosis. *Ann Thorac Surg* 82(6): 2111–2115. doi: 10.1016/j.athoracsur.2006.07.048
31. Bach DS, Siao D, Girard SE et al. (2009) Evaluation of patients with severe symptomatic aortic stenosis who do not undergo aortic valve replacement: the potential role of subjectively overestimated operative risk. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2(6): 533–539. doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.109.848259
32. Bouma BJ, van den Brink RB, van der Meulen JH et al. (1999) To operate or not on elderly patients with aortic stenosis: the decision and its consequences. *Heart* 82(2): 143–148
33. Adams DH, Popma JJ, Reardon MJ et al. (2014) Transcatheter aortic-valve replacement with a self-expanding prosthesis. *N Engl J Med* 370(19): 1790–1798. doi: 10.1056/NEJMoa1400590.
34. Leon Martin B., Smith Craig R., Mack Michael et al. Transcatheter Aortic-Valve Implantation for Aortic Stenosis in Patients Who Cannot Undergo Surgery

35. Schmid C (2007) Leitfaden Erwachsenenherzchirurgie. Steinkopff, Darmstadt
36. Leclercq F, Akodad M, Macia J-C et al. (2015) Vascular Complications and Bleeding After Transfemoral Transcatheter Aortic Valve Implantation Performed Through Open Surgical Access. *Am J Cardiol* 116(9): 1399–1404. doi: 10.1016/j.amjcard.2015.08.003
37. Smith Craig R., Leon Martin B., Mack Michael J. et al. Transcatheter versus Surgical Aortic-Valve Replacement in High-Risk Patients
38. Zahn R, Gerckens U, Grube E et al. (2011) Transcatheter aortic valve implantation: first results from a multi-centre real-world registry. *Eur Heart J* 32(2): 198–204. doi: 10.1093/eurheartj/ehq339
39. Eltchaninoff H, Prat A, Gilard M et al. (2011) Transcatheter aortic valve implantation: early results of the FRANCE (FRench Aortic National CoreValve and Edwards) registry. *Eur Heart J* 32(2): 191–197. doi: 10.1093/eurheartj/ehq261
40. Rodes-Cabau J, Webb JG, Cheung A et al. (2010) Transcatheter aortic valve implantation for the treatment of severe symptomatic aortic stenosis in patients at very high or prohibitive surgical risk: acute and late outcomes of the multicenter Canadian experience. *J Am Coll Cardiol* 55(11): 1080–1090. doi: 10.1016/j.jacc.2009.12.014
41. Buellesfeld L, Gerckens U, Schuler G et al. (2011) 2-year follow-up of patients undergoing transcatheter aortic valve implantation using a self-expanding valve prosthesis. *J Am Coll Cardiol* 57(16): 1650–1657. doi: 10.1016/j.jacc.2010.11.044
42. Thomas M, Schymik G, Walther T et al. (2011) One-year outcomes of cohort 1 in the Edwards SAPIEN Aortic Bioprosthesis European Outcome (SOURCE) registry: the European registry of transcatheter aortic valve implantation using the Edwards SAPIEN valve. *Circulation* 124(4): 425–433. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.001545

43. Thomas M, Schymik G, Walther T et al. (2010) Thirty-day results of the SAPIEN aortic Bioprosthesis European Outcome (SOURCE) Registry: A European registry of transcatheter aortic valve implantation using the Edwards SAPIEN valve. *Circulation* 122(1): 62–69. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.907402
44. Tamburino C, Capodanno D, Ramondo A et al. (2011) Incidence and predictors of early and late mortality after transcatheter aortic valve implantation in 663 patients with severe aortic stenosis. *Circulation* 123(3): 299–308. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.946533
45. Takkenberg JJM, Klieverik LMA, Schoof PH et al. (2009) The Ross procedure: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 119(2): 222–228. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.726349
46. Simon P (2001) Growth of the pulmonary autograft after the Ross operation in childhood. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 19(2): 118–121. doi: 10.1016/S1010-7940(00)00638-2
47. Solymar L, Sudow G, Holmgren D (2000) Increase in size of the pulmonary autograft after the Ross operation in children: growth or dilation? *J Thorac Cardiovasc Surg* 119(1): 4–9
48. ROSS DN (1962) Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 2(7254): 487
49. Aklog L, Carr-White GS, Birks EJ et al. (2000) Pulmonary autograft versus aortic homograft for aortic valve replacement: interim results from a prospective randomized trial. *J Heart Valve Dis* 9(2): 176-88; discussion 188-9
50. Kamperidis V, Hadjimiltiades S, Ziakas A et al. (2015) Balloon valvuloplasty as destination therapy in elderly with severe aortic stenosis: a cardiac catheterization study. *J Geriatr Cardiol* 12(3): 218–225. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2015.03.009

51. Balmer C, Beghetti M, Fasnacht M et al. (2004) Balloon aortic valvoplasty in paediatric patients: progressive aortic regurgitation is common. *Heart* 90(1): 77–81
52. Justo RN, McCrindle BW, Benson LN et al. (1996) Aortic valve regurgitation after surgical versus percutaneous balloon valvotomy for congenital aortic valve stenosis. *Am J Cardiol* 77(15): 1332–1338
53. Sacks MS, David Merryman W, Schmidt DE (2009) On the biomechanics of heart valve function. *J Biomech* 42(12): 1804–1824. doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.05.015
54. Sucosky P, Balachandran K, Elhammali A et al. (2009) Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(2): 254–260. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.176347
55. Riem Vis PW, van Rijswijk J-W, Chamuleau SAJ et al. (2012) The pathophysiological basis of pharmacological interventions in CAVD. *Neth Heart J* 20(6): 270–278. doi: 10.1007/s12471-011-0230-1
56. Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV (2010) Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 13(1): 39–75. doi: 10.1089/ars.2009.2733
57. Mathieu P, Poirier P, Pibarot P et al. (2009) Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension* 53(4): 577–584. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.110320
58. Cote N, Pibarot P, Pepin A et al. (2010) Oxidized low-density lipoprotein, angiotensin II and increased waist circumference are associated with valve inflammation in prehypertensive patients with aortic stenosis. *Int J Cardiol* 145(3): 444–449. doi: 10.1016/j.ijcard.2009.05.054

59. Charest A, Pepin A, Shetty R et al. (2006) Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis. *Heart* 92(12): 1844–1849. doi: 10.1136/hrt.2005.086595
60. Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K et al. (2006) Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. *Nat Med* 12(10): 1151–1159. doi: 10.1038/nm1476
61. Soini Y, Salo T, Satta J (2003) Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Human Pathology* 34(8): 756–763. doi: 10.1016/S0046-8177(03)00245-4
62. Chalajour F, Treede H, Ebrahimnejad A et al. (2004) Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis. *Exp Cell Res* 298(2): 455–464. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.04.034
63. Byon CH, Javed A, Dai Q et al. (2008) Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem* 283(22): 15319–15327. doi: 10.1074/jbc.M800021200
64. Shao J-S, Cheng S-L, Pingsterhaus JM et al. (2005) Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J. Clin. Invest.* 115(5): 1210–1220. doi: 10.1172/JCI200524140
65. Miller JD, Chu Y, Brooks RM et al. (2008) Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol* 52(10): 843–850. doi: 10.1016/j.jacc.2008.05.043
66. Lai C-F, Shao J-S, Behrmann A et al. (2012) TNFR1-activated reactive oxidative species signals up-regulate osteogenic Msx2 programs in aortic myofibroblasts. *Endocrinology* 153(8): 3897–3910. doi: 10.1210/en.2012-1216

67. Masters KS, Shah DN, Leinwand LA et al. (2005) Crosslinked hyaluronan scaffolds as a biologically active carrier for valvular interstitial cells. *Biomaterials* 26(15): 2517–2525. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.018
68. Sun L, Rajamannan NM, Sucosky P (2011) Design and validation of a novel bioreactor to subject aortic valve leaflets to side-specific shear stress. *Ann Biomed Eng* 39(8): 2174–2185. doi: 10.1007/s10439-011-0305-6
69. Tompkins RG, Schnitzer JJ, Yarmush ML (1989) Macromolecular transport within heart valves. *Circ Res* 64(6): 1213–1223
70. Mathieu P, Voisine P, Pepin A et al. (2005) Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis* 14(3): 353–357
71. Mathieu P, Boulanger M-C (2014) Basic mechanisms of calcific aortic valve disease. *Can J Cardiol* 30(9): 982–993. doi: 10.1016/j.cjca.2014.03.029
72. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C et al. (2001) Bone Formation and Inflammation in Cardiac Valves. *Circulation* 103(11): 1522–1528. doi: 10.1161/01.CIR.103.11.1522
73. Towler DA (2005) Inorganic pyrophosphate: a paracrine regulator of vascular calcification and smooth muscle phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(4): 651–654. doi: 10.1161/01.ATV.0000158943.79580.9d
74. Goding JW, Grobбен B, Slegers H (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1638(1): 1–19. doi: 10.1016/S0925-4439(03)00058-9
75. Cote N, El Hussein D, Pepin A et al. (2012) ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve. *J Mol Cell Cardiol* 52(5): 1191–1202. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.02.003

76. O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD et al. (1995) Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 92(8): 2163–2168
77. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E et al. (2011) 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* 124(16): 1783–1791. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.006767
78. Merryman WD, Schoen FJ (2013) Mechanisms of calcification in aortic valve disease: role of mechanokinetics and mechanodynamics. *Curr Cardiol Rep* 15(5): 355. doi: 10.1007/s11886-013-0355-5
79. Wirrig EE, Hinton RB, Yutzey KE (2011) Differential expression of cartilage and bone-related proteins in pediatric and adult diseased aortic valves. *J Mol Cell Cardiol* 50(3): 561–569. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.12.005
80. Lerman DA, Prasad S, Alotti N (2016) Using Na₃PO₄ to Enhance In vitro Animal Models of Aortic Valve Calcification. *Int J Cardiovasc Res* 5(1). doi: 10.4172/2324-8602.1000250
81. Bowler MA, Merryman WD (2015) In vitro models of aortic valve calcification: solidifying a system. *Cardiovasc Pathol* 24(1): 1–10. doi: 10.1016/j.carpath.2014.08.003
82. Ali ML, Kumar SP, Bjornstad K et al. (1996) The sheep as an animal model for heart valve research. *Cardiovasc Surg* 4(4): 543–549
83. Sider KL, Blaser MC, Simmons CA (2011) Animal models of calcific aortic valve disease. *Int J Inflam* 2011: 364310. doi: 10.4061/2011/364310
84. Balachandran K, Konduri S, Sucosky P et al. (2006) An ex vivo study of the biological properties of porcine aortic valves in response to circumferential cyclic stretch. *Ann Biomed Eng* 34(11): 1655–1665. doi: 10.1007/s10439-006-9167-8

85. Sun L, Sucosky P (2015) Bone morphogenetic protein-4 and transforming growth factor-beta1 mechanisms in acute valvular response to supra-physiologic hemodynamic stresses. *World J Cardiol* 7(6): 331–343. doi: 10.4330/wjc.v7.i6.331
86. Sun L, Rajamannan NM, Sucosky P (2013) Defining the role of fluid shear stress in the expression of early signaling markers for calcific aortic valve disease. *PLoS One* 8(12): e84433. doi: 10.1371/journal.pone.0084433
87. Sun L, Chandra S, Sucosky P (2012) Ex vivo evidence for the contribution of hemodynamic shear stress abnormalities to the early pathogenesis of calcific bicuspid aortic valve disease. *PLoS One* 7(10): e48843. doi: 10.1371/journal.pone.0048843
88. Aubin S Etablierung und Charakterisierung eines voll automatisierten computergesteuerten Bioreaktors zur Rebesiedelung von dezellularisierten Herzklappen mit Endothelzellen unter physiologischen Parametern und Flussbedingungen. Heidelberg, Univ., Diss., 2014
89. Balachandran K, Sucosky P, Jo H et al. (2010) Elevated cyclic stretch induces aortic valve calcification in a bone morphogenic protein-dependent manner. *Am J Pathol* 177(1): 49–57. doi: 10.2353/ajpath.2010.090631
90. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F et al. (2005) Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: Matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg* 27(4): 566–571. doi: 10.1016/j.ejcts.2004.12.052
91. Hennig B, Boissonneault GA, Glauert HP (1989) Effects of serum type on growth and permeability properties of cultured endothelial cells. *Exp Cell Res* 181(2): 589–596. doi: 10.1016/0014-4827(89)90116-X
92. Gronowicz G, Woodiel FN, McCarthy MB et al. (1989) In vitro mineralization of fetal rat parietal bones in defined serum-free medium: Effect of beta-glycerol phosphate. *J Bone Miner Res* 4(3): 313–324. doi: 10.1002/jbmr.5650040305

93. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W et al. (2004) Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: Role of matrix metalloproteinases. *Circulation* 110(22): 3480–3487. doi: 10.1161/01.CIR.0000148367.08413.E9
94. Tseng H, Grande-Allen KJ (2011) Elastic fibers in the aortic valve spongiosa: A fresh perspective on its structure and role in overall tissue function. *Acta Biomater* 7(5): 2101–2108. doi: 10.1016/j.actbio.2011.01.022
95. Hinton RB, Lincoln J, Deutsch GH et al. (2006) Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. *Circ Res* 98(11): 1431–1438. doi: 10.1161/01.RES.0000224114.65109.4e
96. Yip CYY, Simmons CA (2011) The aortic valve microenvironment and its role in calcific aortic valve disease. *Cardiovasc Pathol* 20(3): 177–182. doi: 10.1016/j.carpath.2010.12.001

6. ANHANG

Anfertigungen der erwähnten Lösungen und Puffer

Alkalischer Alkohol, 400ml

360ml Ethanol (96%) mit 40ml Ammoniumhydroxid (30%) mischen.

Alkoholisches Hämatoxylin (2%), 500ml

10g Hämatoxylin wird in 500ml 96%iger Ethanol gelöst.

Alkoholischer Safran, 200ml

12g Safran du Gatinais wird in 200ml Ethanol (100%) gelöst.

Bouin's Lösung, 420ml

300ml Pikrinsäure mit 100ml Formaldehyd (37-40%) und 20ml Essigsäure (100%) mischen.

Brilliant Crocein R Stock, 400ml

4g Brilliant Crocein R mit 398ml destilliertem Wasser versetzen.

Crocein-Säurefuchsin, 100ml

80ml Brilliant Crocein R Stock mit 20ml Säurefuchsin Stock mischen.

Eisenchlorid, 500ml

12,4g Eisen-Chlorid-Hexahydrat wird in 500ml destilliertem Wasser mit 5ml Salzsäure (32-37%) gelöst.

Eosin-Lösung

1 g Eosin in 100 ml destilliertem Wasser, 100 ml Ethanol (100%) und 200 µl Eisessig lösen.

Jodlösung, 500ml

10g Jod mit 20g Kaliumjodid und 500ml destilliertem Wasser gemischt und 24h ruhen lassen.

Lysepuffer

50mM HEPES (pH 7,4) mit 1% TritonX100, 10%Complete Protease-Inhibitoren und 10% PhosphoStop versetzen.

Natriumkarbonat-Formaldehydlösung

150ml destilliertes Wasser mit 50ml Formaldehyd und 10g Natriumcarbonat lösen.

Säurefuchsin Stock, 500ml

Zu 0,5g Säurefuchsin 497,5ml destilliertes Wasser und 2,5ml Essigsäure (100%) geben. Die entstehende Lösung wird gefiltert und 24h stehen gelassen.

Silbernitratlösung (5%)

200ml destilliertes Wasser mit 10g Silbernitrat mischen.

Weigert's Eisenhämatoxylin, 120ml

60ml Hämatoxylin (2%) mit 40ml Eisenchlorid und 20ml Jodlösung mischen.

DANKSAGUNGEN

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Payam Akhyari für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Arbeit und seine Betreuung. Seine fachliche Kompetenz und Zielstrebigkeit dienten mir immer als Vorbild.

Bei Herrn Prof. Dr. Artur Lichtenberg bedanke ich mich für die Möglichkeit in seiner Abteilung unter optimalen Arbeitsbedingungen forschen und promovieren zu können.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Preuß danke ich für die Beratung bei Fragen zum Bioreaktor sowie der Hilfe bei der Behebung von technischen Störungen.

Herrn Rohrbacher danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Optimierung der Insertionsstelle der pH-Sonde.

Ein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe der Experimentellen Chirurgie und allen Labormitarbeitern, die sich Zeit genommen haben um mich in die Arbeitsabläufe einzuarbeiten und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Naima Niazy für ihre besonders intensive und engagierte Betreuung. Vom Beginn der ersten Vorversuche bis zur Korrektur der vorliegenden Arbeit unterstützte sie mich unermüdlich mit Rat und Tat. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die in schwierigen Zeiten für ausreichend Motivationsschub sorgten und die sich Zeit genommen haben die vorliegende Arbeit auf Herz und Nieren zu prüfen. Ohne euch hätte sich diese Arbeit weitaus langwieriger gestaltet und ich hätte nicht so viel Freude daran gehabt.