

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff



**Effekte der intramyokardialen autologen Transplantation  
mononukleärer Zellen aus dem Nabelschnurblut  
in einem neuen Modell zur Induktion einer chronischen  
rechtsventrikulären Volumenbelastung im Schafmodell**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
Stephanie Nemati  
geboren am 04.11.1982 in Frankfurt an der Oder  
aus Rostock

Rostock, 18.09.2009

Dekan: Prof. Dr. med. habil. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff, Klinik und Poliklinik  
für Herzchirurgie Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Matthias Peuster, Pädiatrische  
Kardiologie und Intensivmedizin Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Motz, Klinik für Kardiologie  
Karlsburg

Promotionsverteidigung: 06. Juli 2010

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| 1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG.....   | 7  |
| 1.1 Angeborene Herzfehler.....   | 7  |
| 1.2 Fallot'sche Tetralogie.....  | 8  |
| 1.2.1 Pathophysiologie der Fallot'schen Tetralogie.....  | 9  |
| 1.2.2 Diagnostik.....  | 11 |
| 1.2.3 Chirurgische Behandlung der Fallot'schen Tetralogie.....   | 11 |
| 1.2.3.1 Primäre Korrektur.....   | 12 |
| 1.2.3.2 Rekonstruktion des rechtsventrikulären Ausflusstraktes<br>mit einer transanulären Erweiterungsplastik.....                       | 13 |
| 1.2.3.3 Langzeitfolgen der chirurgischen Korrektur.....  | 13 |
| 1.3 Pulmonalklappeninsuffizienz und rechtsventrikuläre Volumenbelastung<br>nach chirurgischer Korrektur der Fallot'schen Tetralogie..... | 14 |
| 1.4 Definition Stammzelle.....   | 15 |
| 1.5 Kardiale Stammzellen.....  | 15 |
| 1.6 Stammzellen in der regenerativen Medizin.....  | 15 |
| 1.7 Stammzellen aus dem Nabelschnurblut.....   | 16 |
| 1.7.1 Therapeutische Einsatzmöglichkeiten der Stammzellen aus dem<br>Nabelschnurblut.....  | 17 |
| 1.7.2 Nabelschnurblut und kardiovaskuläre Therapie.....  | 17 |
| 1.8 Zielstellung.....  | 19 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN.....   | 20 |
| 2.1 Material.....  | 20 |
| 2.1.1 Hardware.....  | 20 |
| 2.1.2 Software.....  | 21 |
| 2.1.3 Zellseparation.....  | 21 |
| 2.1.4 FACS-Analyse und Kultivierung.....   | 22 |
| 2.1.5 Immunhistologie.....   | 22 |
| 2.1.6 OP-Materialien.....  | 23 |
| 2.1.7 Medikamente.....   | 24 |
| 2.2 Versuchstiere .....  | 24 |
| 2.3 Haltungsbedingungen.....   | 25 |
| 2.4 Versuchsablauf.....  | 25 |
| 2.5 Entnahme des Nabelschnurblutes.....  | 26 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.6 Isolation der mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut.....           | 27        |
| 2.6.1 FACS-Analyse.....   | 28        |
| 2.6.2 Kultivierung der mononukleären Zellen.....                              | 28        |
| 2.6.3 AcLDL- Färbung.....   | 28        |
| 2.7 Das neue Modell der chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung..... | 29        |
| 2.8 Anästhesie und perioperatives Management.....                             | 30        |
| 2.9 Monitoring.....   | 31        |
| 2.10 Erster Operationstag.....  | 31        |
| 2.10.1 Präparation des Herzens.....   | 31        |
| 2.10.2 Swan-Ganz-Katheter-Messungen.....                                      | 31        |
| 2.10.3 Konduktanz-Katheter-Messungen.....                                     | 32        |
| 2.10.4 Vorlastreduktionsmanöver.....  | 33        |
| 2.10.5 Chirurgische Induktion des Klappenschadens.....                        | 33        |
| 2.10.6 Validierung der akuten Pulmonalklappeninsuffizienz.....                | 33        |
| 2.10.7 Zellinjektion.....   | 35        |
| 2.10.8 Beendigung der ersten Operation.....                                   | 35        |
| 2.11 Reoperation nach 3 Monaten.....  | 36        |
| 2.11.1 Dobutamin-Stress-Messungen.....  | 36        |
| 2.11.2 Euthanasie und Explantation.....                                       | 36        |
| 2.12 Analyse der laborchemischen Parameter.....                               | 37        |
| 2.12.1 Herzspezifische Enzyme.....  | 37        |
| 2.12.2 Routinelabor.....  | 37        |
| 2.13 Transthorakale Echokardiographie.....                                    | 37        |
| 2.14 Kardiale Computertomographie.....  | 38        |
| 2.15 Makroskopische und mikroskopische Beurteilung des Herzens.....           | 38        |
| 2.15.1 Vorbereitung der Schnitte.....   | 38        |
| 2.15.2. Histologische Auswertung.....   | 39        |
| 2.15.3 Auswertung der Goldner-Färbung.....                                    | 39        |
| 2.15.4 CD31-Immunfluoreszenz-Färbung.....                                     | 39        |
| 2.15.5 Auswertung der CD31-Immunfluoreszenz-Färbung.....                      | 41        |
| 2.16 Statistische Analyse.....  | 41        |
| <b>3 ERGEBNISSE.....</b>  | <b>42</b> |
| 3.1 Transplantation der isolierten mononukleären Zellen.....                  | 42        |
| 3.1.1 FACS-Analyse.....   | 42        |
| 3.1.2 AcLDL-Färbung.....  | 42        |
| 3.2 Mortalität und Morbidität.....  | 43        |

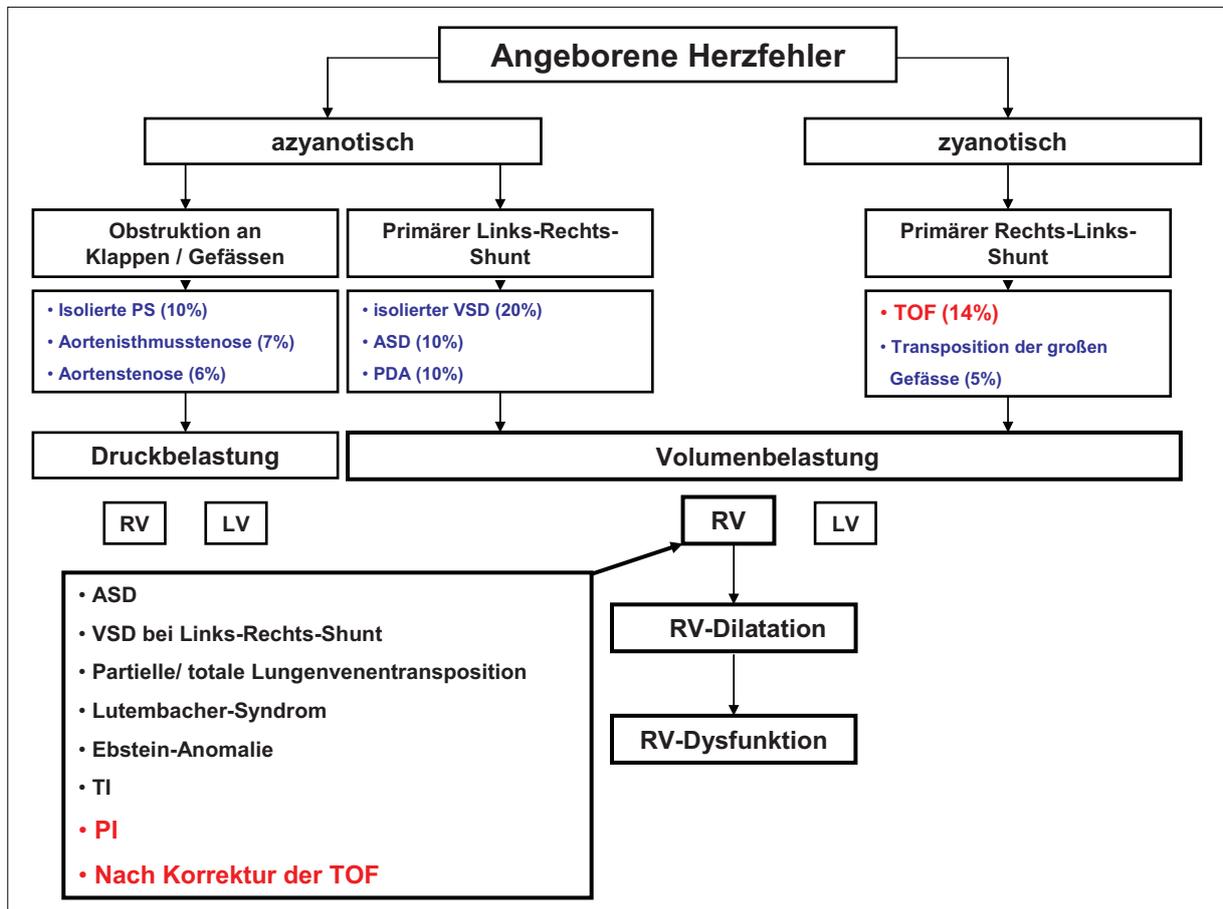
|  |           |
|--|-----------|
| 3.3 Erfolg des chirurgischen Modells.....  | 45        |
| 3.4 Swan-Ganz-Katheter-Messungen.....  | 45        |
| 3.5 Konduktanz-Katheter-Messungen.....   | 46        |
| 3.5.1 Parameter zur Auswertung der hämodynamischen Messungen.....  | 46        |
| 3.5.2 Präoperative Messungen der rechtsventrikulären Herzfunktion.....   | 47        |
| 3.5.3 Frühe postoperative Messungen.....   | 48        |
| 3.5.3.1 Systolische Funktion.....  | 48        |
| 3.5.3.2 Diastolische Funktion.....   | 49        |
| 3.5.4 Postoperative Messungen der rechtsventrikulären Herzfunktion<br>nach 3 Monaten.....  | 50        |
| 3.5.4.1 Systolische Funktion unter Ruhebedingungen.....  | 50        |
| 3.5.4.2 Systolische Funktion in der Dobutamin-Stress-Messung.....  | 52        |
| 3.5.4.3 Diastolische Funktion unter Ruhebedingungen.....   | 52        |
| 3.5.4.4 Diastolische Funktion in der Dobutamin-Stress-Messung.....   | 53        |
| 3.5.4.5 Vorlastreduktionsmanöver.....  | 53        |
| 3.6 Transthorakale Echokardiographie.....  | 56        |
| 3.7 Kardiale Computertomographie.....  | 57        |
| 3.8 Auswertung der Laborparameter.....   | 57        |
| 3.9 Makroskopische Beurteilung.....  | 60        |
| 3.10 Histologie.....   | 60        |
| 3.10.1 Histologische Auswertung.....   | 60        |
| 3.10.2 Interstitielle Fibrose.....   | 62        |
| 3.10.3 Kapillardichte.....   | 63        |
| <b>4 DISKUSSION.....</b>   | <b>65</b> |
| 4.1 Klinische Relevanz.....  | 65        |
| 4.2 Validität der Methode.....   | 68        |
| 4.3 Effektivität und Sicherheit der intramyokardialen autologen<br>Transplantation der mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut..... | 70        |
| 4.4 Grenzen der Studie.....  | 72        |
| <b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>  | <b>74</b> |
| <b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>   | <b>75</b> |
| <b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>  | <b>86</b> |
| <b>8 CURRICULUM VITAE.....</b>   | <b>90</b> |
| <b>9 DANKSAGUNG.....</b>   | <b>93</b> |
| <b>10 ANHANG.....</b>  | <b>94</b> |

## 1. Einleitung und Zielstellung

### 1.1 Angeborene Herzfehler

In Deutschland kommen jährlich circa 6000 Kinder mit einer Fehlbildung des Herzens oder der großen Gefäße zur Welt. Das entspricht einem Anteil von 0,7% bis 0,8% der Neugeborenen. Angeborene Herzfehler haben in der Gruppe der nativen Fehlbildungen die höchste Inzidenz. Die klinische Bedeutung dessen liegt vor allem in der hohen Sterblichkeit [1]. Unbehandelt sterben bis zu 25% der betroffenen Patienten im Säuglingsalter und weitere 55% innerhalb der ersten Lebensjahre. Das Erwachsenenalter erlangen unbehandelt nur 15% der Patienten. Aufgrund der Fortschritte in der modernen Medizin erreichen heute circa 90% aller Menschen mit angeborenem Herzfehler das Erwachsenenalter. In den meisten Fällen sind solche Patienten jedoch chronisch krank, da sie nach den Operationen häufig durch Restbefunde oder Folgeerkrankungen in ihrer Lebensqualität eingeschränkt sind und intensiver kardiologischer Betreuung bedürfen. Die häufigste Ursache für eine Herzinsuffizienz im Kindesalter ist die Volumenbelastung durch einen Links-Rechts-Shunt [2]. Nach hämodynamischen Gesichtspunkten ergibt sich eine Untergliederung der Herzfehler in azyanotische oder zyanotische Vitien. Verursacht werden die Vitien am häufigsten durch die Obstruktion an einer Klappe bzw. an einem Gefäß oder es besteht ein Rechts-Links-Shunt bzw. ein Links-Rechts-Shunt. Die Folgen bedingen eine Druckbelastung oder eine Volumenbelastung der beanspruchten Herzregion (Abb. 1). Die rechtsventrikuläre Volumenbelastung, die bei einem Atriumseptumdefekt (ASD), einem Ventrikelseptumdefekt (VSD), einer Lungenvenentransposition, einer Trikuspidalklappeninsuffizienz (TI) und einer Pulmonalklappeninsuffizienz (PI) sowie bei dem Lutembacher-Syndrom vorkommt, führt zu einer exzentrischen Hypertrophie mit Dilatation des rechten Ventrikels [3], die in eine rechtsventrikuläre Dysfunktion [4] mit verminderter Belastbarkeit, Neigung zu supraventrikulären und ventrikulären Arrhythmien, der Ausbildung einer Stauungsinsuffizienz und zum plötzlichen Herztod führen kann [5, 6]. Die rechtsventrikuläre Dysfunktion stellt ein ernstes klinisches Problem dar, dessen Pathomechanismen bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt sind [7]. Der Erforschung der Morphologie des rechten Ventrikels (RV), der rechtsventrikulären Funktion und der Adaptationsmechanismen kommt mit Hinblick auf die angeborenen Herzfehler eine große Bedeutung zu. Bei Patienten mit angeborenem Herzfehler unterstützt der RV entweder die pulmonale (subpulmonaler RV) oder die systemische Zirkulation (systemischer RV) [8]. Der RV ist von entscheidender Relevanz, denn die systolische und die diastolische rechtsventrikuläre Dysfunktion üben einen großen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität der Patienten mit angeborenem Herzfehler aus [8]. In der Chirurgie der angeborenen Herzfehler sind in den letzten Jahren viele Fortschritte erzielt worden.

Ein wesentlicher Erfolg konnte in der Korrektur der Fallot'schen Tetralogie, dem häufigsten angeborenen primär-zyanotischen Herzfehler erzielt werden, wenngleich die Langzeitergebnisse durch die Ausbildung einer rechtsventrikulären Volumenbelastung noch limitiert sind [3, 9, 10, 11].

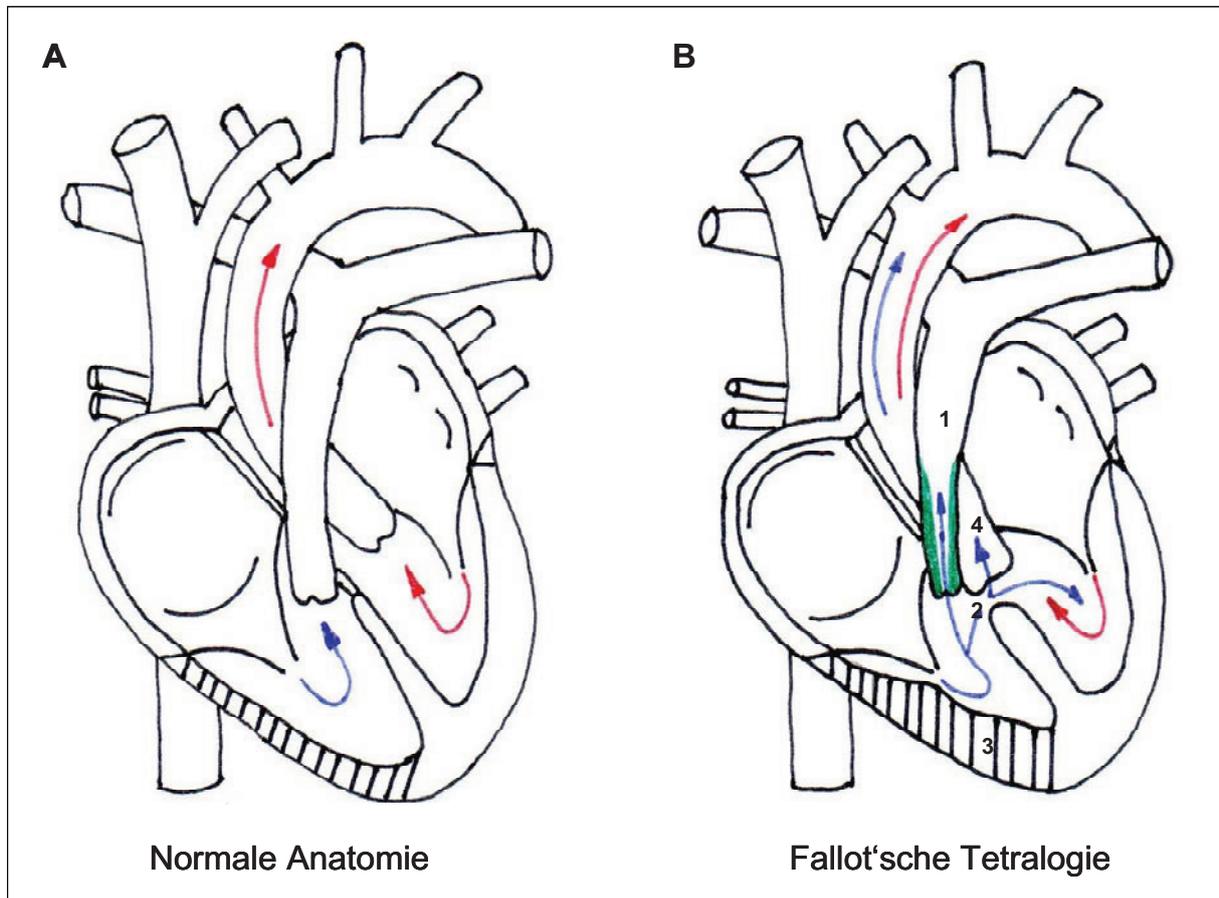


**Abb. 1:** Einteilung der angeborenen Herzfehler. Die 8 häufigsten Erscheinungsformen sind blau hervorgehoben. Die Folgen für das Herz sind sowohl in der Druckbelastung als auch in der Volumenbelastung zu sehen. ASD: Atriumseptumdefekt, LV: linker Ventrikel, PDA: persistierender Ductus arteriosus Botalli, PI: Pulmonalklappeninsuffizienz, PS: Pulmonalklappenstenose, RV: rechter Ventrikel, TI: Trikuspidalklappeninsuffizienz, TOF: Fallot'sche Tetralogie, VSD: Ventrikelseptumdefekt

## 1.2 Fallot'sche Tetralogie

Die Fallot'sche Tetralogie ist mit einem Vorkommen von 10% aller angeborenen Herzfehler die häufigste primär-zyanotische kardiale Fehlbildung. Die klassische Fallot'sche Tetralogie (Abb. 2), die 1888 von Etienne Fallot zum ersten Mal beschrieben wurde, ist eine komplexe Herzfehlbildung.

Zu den vier klassischen Komponenten gehören die infundibuläre bzw. die valvuläre Pulmonalklappenstenose, der große, hochsitzende, subaortale Ventrikelseptumdefekt, der vergrößerte Durchmesser der nach rechts verlagerten Aorta ascendens (überreitende Aorta) und die rechtsventrikuläre Hypertrophie.

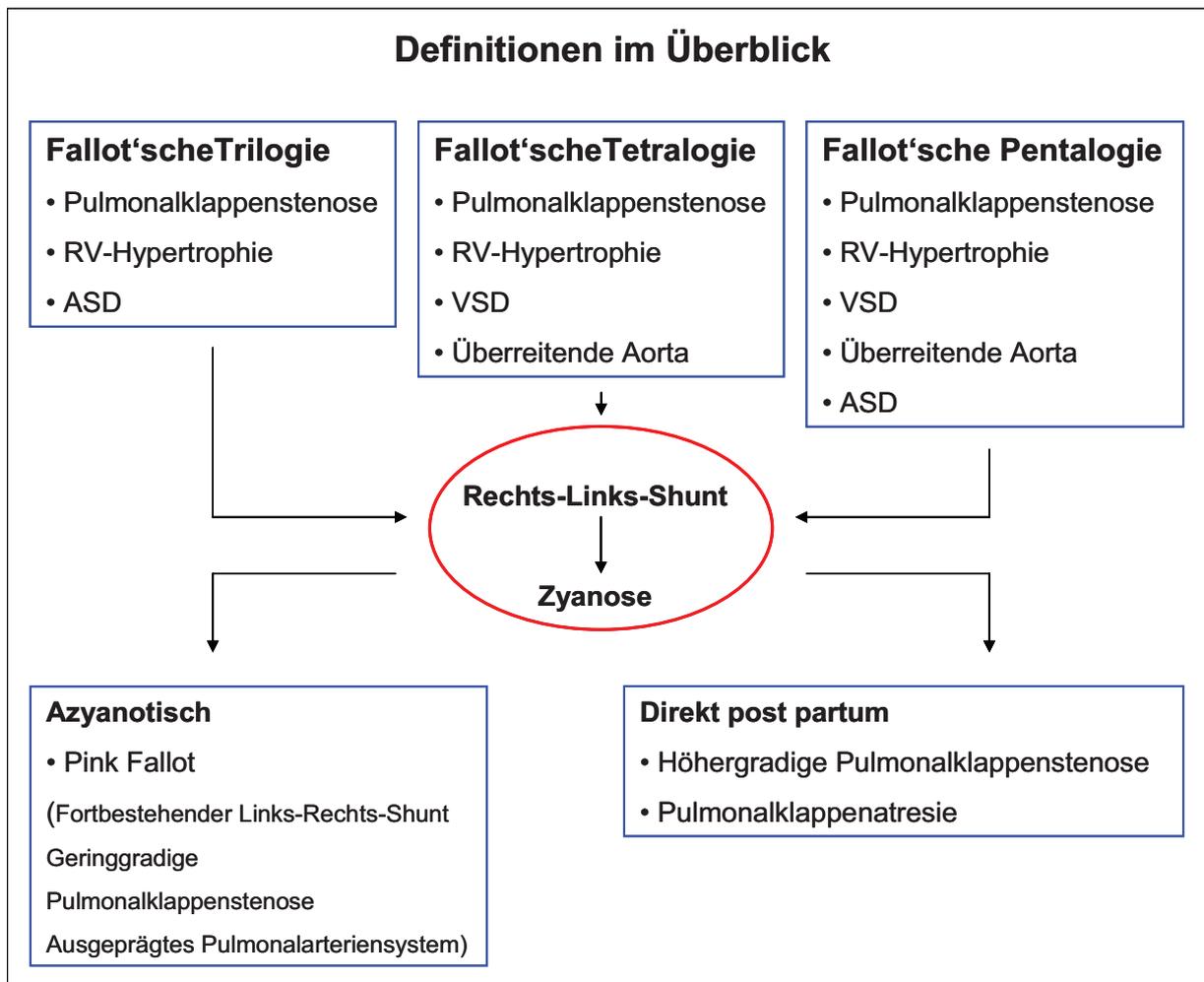


**Abb. 2:** Längsschnitt des Herzens mit normaler Anatomie (A) und mit den pathologischen Komponenten bei Fallot'scher Tetralogie (B): 1 Pulmonalklappenstenose, 2 Ventrikelseptumdefekt, 3 rechtsventrikuläre Hypertrophie und 4 überreitende Aorta (eigenhändige Zeichnung)

### 1.2.1 Pathophysiologie der Fallot'schen Tetralogie

Die Ursache der Fallot'schen Tetralogie liegt in einer Entwicklungsstörung des infundibulären Septums (sogenannte Konusseptum). Die links-anterior-superiore Verlagerung des aortopulmonalen Septums ist verantwortlich für die stets vorhandene infundibuläre Pulmonalklappenstenose und den hochsitzenden, subaortal gelegenen Ventrikelseptumdefekt (VSD), über dem die Aorta „reitet“. Durch die Pulmonalklappenstenose wird die reaktive Druckhypertrophie des rechten Ventrikels provoziert. Die Klinik ist abhängig von Befunden zum Ausmaß der Lungenperfusion und der Ausprägung des Lungengefäßsystems sowie dem Grad der Pulmonalklappenstenose. In den ersten Lebensmonaten kann die Zyanose noch fehlen, da anfangs zumeist noch ein Links-Rechts-Shunt über dem VSD besteht.

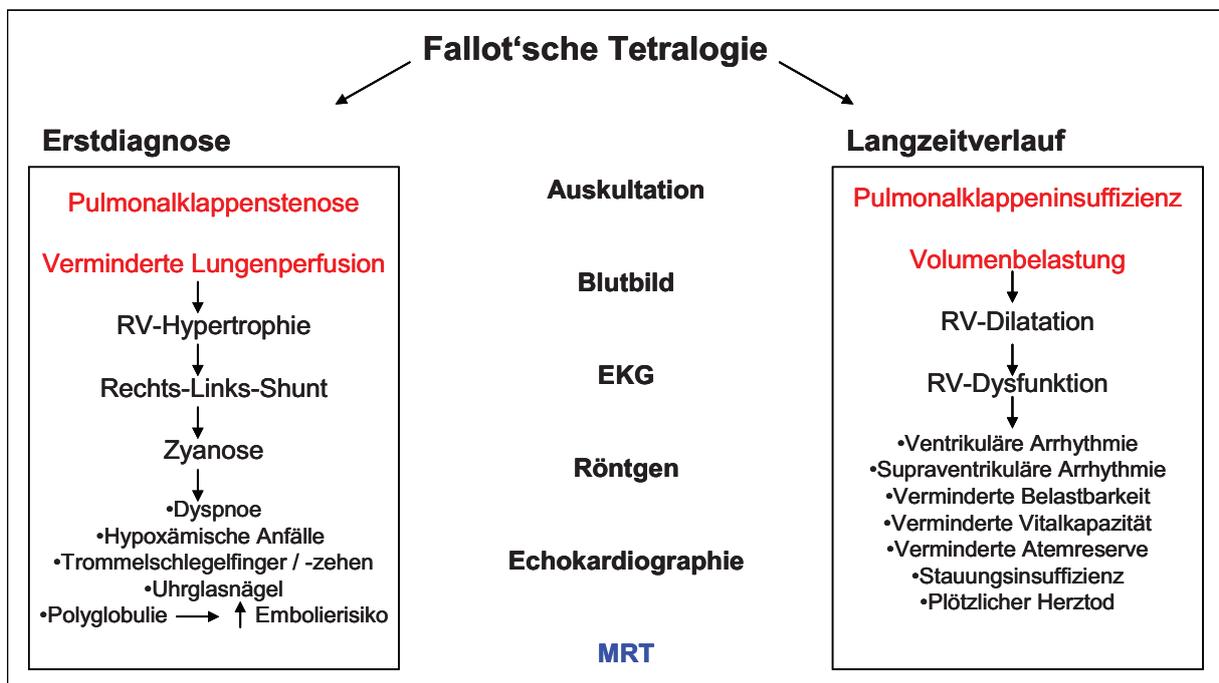
Der Circulus vitiosus aus reaktiver Hypertrophie des rechten Ventrikels (RV) und fortschreitender Verengung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (RVOT) führt zur Shuntumkehr. Der progrediente Rechts-Links-Shunt bedingt, oftmals erst jenseits des 6. Lebensmonats, ein erhöhtes Shuntvolumen sowie einen verminderten pulmonalen Blutfluss. Dadurch wird eine zentrale Zyanose verursacht. Eine höhergradige Stenose bewirkt eine Zyanose, die von Geburt an vorhanden ist. Eine ausreichend weite Pulmonalklappe hingegen führt nicht zu einem Rechts-Links-Shunt und bleibt demzufolge azyanotisch. Dieses Phänomen wird als sogenannter „Pink Fallot“ bezeichnet. Von der Fallot'schen Pentalogie spricht man, wenn der klassische Symptomkomplex durch einen Atriumseptumdefekt (ASD) verkompliziert wird (Abb. 3). Typische Folgen der zentralen Zyanose sind Belastungsdyspnoe, hypoxämische Anfälle, Trommelschlegelfinger und -zehen sowie Uhrglasnägel. Die chronisch erniedrigte Sauerstoffsättigung führt zur reaktiven Polyglobulie, die ein erhöhtes Embolierisiko birgt.



**Abb. 3:** Unterschiedliche Varianten des Fallot'schen-Symptomkomplexes. ASD: Atriumseptumdefekt, RV: rechter Ventrikel, VSD: Ventrikelseptumdefekt

### 1.2.2 Diagnostik

Bei der Fallot'schen Tetralogie (Abb. 4) ist in der Auskultation ein spindelförmiges Systolikum im 3. bis 4. Interkostalraum (ICR) rechts parasternal zu hören. Im Elektrokardiogramm (EKG) erkennt man einen Rechtslagetyp, ein P-dextroatriale und Zeichen der rechtsventrikulären Hypertrophie. Das Röntgenbild zeigt die typische Holzschuhform des Herzens mit abgerundeter Herzsilhouette und angehobener Herzspitze. In der Echokardiographie und in der Magnetresonanztomographie (MRT) sind alle Komponenten der Fallot'schen Tetralogie darstellbar. Das MRT manifestiert gegenwärtig den Goldstandard [5] für die Analyse der rechtsventrikulären Volumenverhältnisse sowie für die Beurteilung der rechtsventrikulären Wandkinetik und Morphologie [12].

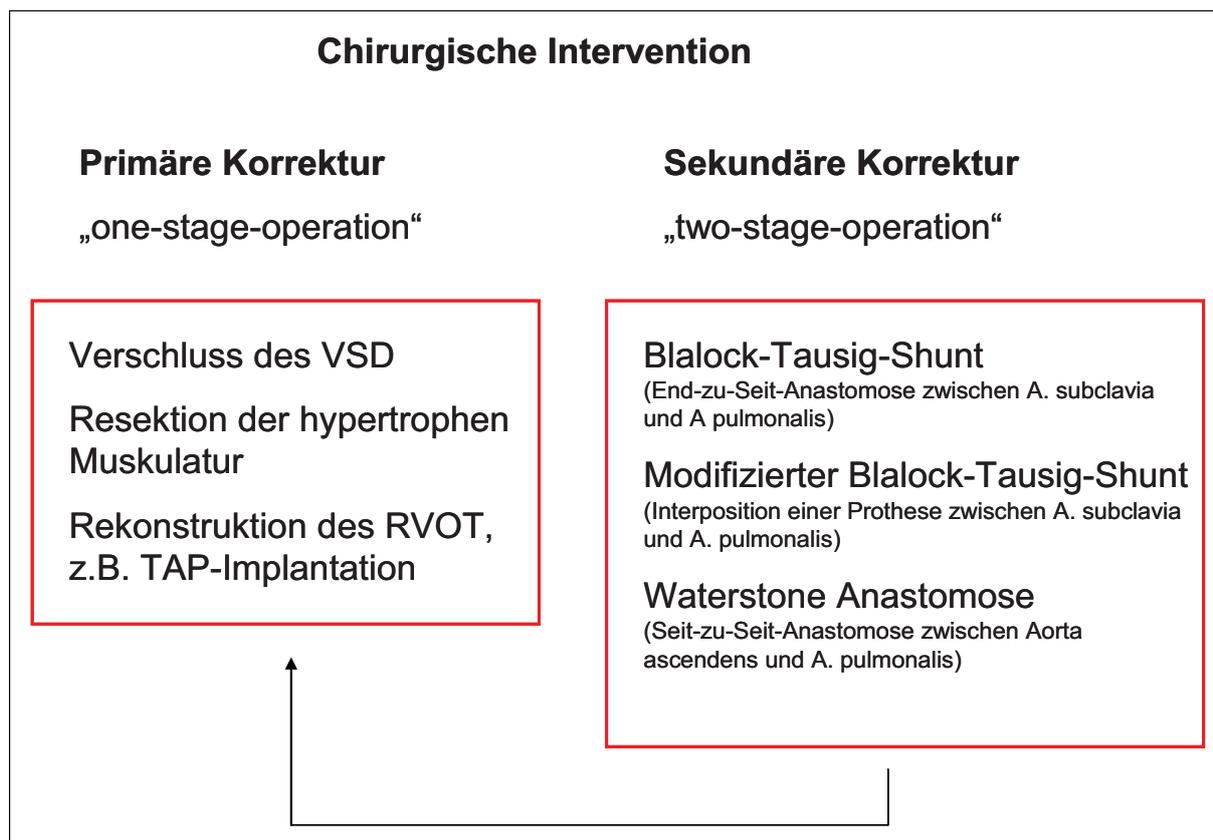


**Abb. 4:** Diagnostik und Befunde, die bei der Erstdiagnose der Fallot'schen Tetralogie und im Langzeitverlauf nach chirurgischer Korrektur der Fallot'schen Tetralogie typisch sind. EKG: Elektrokardiogramm, MRT: Magnetresonanztomographie, RV: rechter Ventrikel

### 1.2.3 Chirurgische Behandlung der Fallot'schen Tetralogie

Die chirurgische Intervention ist bei der Fallot'schen Tetralogie unvermeidbar und sollte innerhalb des ersten Lebensjahres durchgeführt werden, um ein Fortschreiten der Obstruktion des RVOT zu verhindern [13]. Das Ziel des operativen Eingriffs ist die Optimierung des pathologischen pulmonalen Blutflusses. Die chirurgische Standardkorrektur umfasst den Verschluss des VSD, die Resektion der hypertrophen trabekulären Muskelbündel im RV und die Rekonstruktion des RVOT, z.B. mittels Implantation einer transanulären Erweiterungsplastik (TAP). Für die operative Korrektur gibt es prinzipiell zwei Behandlungsansätze (Abb. 5).

Zum einen die primäre Korrektur, die ab dem 6. Lebensmonat routinemäßig angestrebt ist [14], bzw. auch schon bei Neonaten durchgeführt wird [15], und die sekundäre Korrektur mit vorhergehenden palliativen Eingriffen. Das operative Vorgehen ist nicht einheitlich und sollte für die Erzielung bester Resultate an die individuell vorliegende Anatomie angepasst sein [4]. Die perioperative Mortalität beträgt in erfahrenen Zentren weniger als 1% [16]. Eine frühzeitige Korrektur der Fallot'schen Tetralogie berechtigt zur Prognose einer normalen Lebenserwartung [17].



**Abb. 5:** Möglichkeiten der chirurgischen Intervention bei vorliegender Fallot'scher Tetralogie im Überblick. A.: Arteria, RVOT: rechtsventrikulärer Ausflusstrakt, TAP: transanuläre Erweiterungsplastik, VSD: Ventrikelseptumdefekt

### 1.2.3.1 Primäre Korrektur

Die primäre Korrektur ist ab dem Auftreten von Symptomen, unabhängig vom Alter, die bevorzugte Methode der Wahl [18]. Die Vorteile der einzeitigen Korrektur („one-stage-operation“) bestehen im Entfallen der Komplikationen durch palliative Eingriffe [19, 20] und im Vermeiden langanhaltender Zyanose [19, 20] sowie in der Reduzierung der sekundären rechtsventrikulären Hypertrophie [19, 20] und der fortschreitenden Fibrosierung des RVOT [13]. Die primäre Korrektur verhindert die Hemmung der Alveologenese und begünstigt eine normale Entwicklung des pulmonalarteriellen Systems [13, 20, 21].

Die Möglichkeit der primären Korrekturoperation entfällt dann, wenn der Zustand des Kindes einen solchen Eingriff nicht zulässt oder die Lungenstrombahn hypoplastisch ist [20]. In derartigen Fällen stellt das zweizeitige Verfahren mit palliativer Intervention, die zur Verbesserung der Lungenperfusion und zur Minderung der Zyanose führen soll, um eine spätere Korrektur zu ermöglichen, die Alternative dar.

#### 1.2.3.2 Rekonstruktion des rechtsventrikulären Ausflusstraktes mit einer transanulären Erweiterungsplastik

Bei Vorliegen eines hypoplastischen rechtsventrikulären Ausflusstraktes (RVOT) erfolgt die Rekonstruktion bevorzugt durch die Implantation einer transanulären Erweiterungsplastik [22]. Die Indikation für die transanuläre Erweiterungsplastik (TAP) wird intraoperativ gestellt und ist abhängig vom Ausmaß der Obstruktion im RVOT. Der Stenosegrad wird anhand des Indexes nach Nakata [23] oder McGoon [24] bzw. der Angabe für das akzeptable Minimum des Durchmessers des Pulmonalklappenringes nach Pacifico, Kirklin und Blackstone [25] beurteilt. Derzeit wird die routinemäßige Anlage einer TAP allerdings kontrovers diskutiert. Die Nachteile der TAP werden insbesondere in der radikaleren Rekonstruktion des RVOT [26] gesehen, welche langfristig zu einer Pulmonalklappeninsuffizienz [27], zu Änderungen der Wandkinetik im RVOT [26] und zu einer erhöhten Inzidenz an Reoperationen führen kann [20]. Die generelle und routinemäßige Anlage der TAP sollte aus diesen Gründen heutzutage nicht mehr durchgeführt werden [9]. Unter den chirurgischen Optionen wird der Einsatz einer limitierten RVOT-Erweiterungsplastik zum Schutz der Pulmonalklappe bevorzugt [28].

#### 1.2.3.3 Langzeitfolgen der chirurgischen Korrektur

Die unter der Korrektur zusätzlich durchgeführte Infundibulotomie mit Erweiterung des RVOT prädisponiert zu Aneurysmen des RVOT, zu akinetischen myokardialen Regionen [5, 29] und zu einer Pulmonalklappeninsuffizienz [27, 4], die in eine chronische Volumenbelastung des rechten Ventrikels mündet [27, 9]. Die Pulmonalklappeninsuffizienz (PI), die über einen kurzfristigen Zeitraum relativ gut toleriert werden kann [5, 16], wird langfristig betrachtet, aufgrund der rechtsventrikulären Volumenbelastung zum entscheidenden Faktor für eine erhöhte Morbidität und Mortalität unter den Patienten [5, 9].

### **1.3 Pulmonalklappeninsuffizienz und rechtsventrikuläre Volumenbelastung nach chirurgischer Korrektur der Fallot'schen Tetralogie**

Die Schlüsselrolle in der Pathogenese der rechtsventrikulären Volumenbelastung, nach chirurgischer Korrektur der Fallot'schen Tetralogie, wird der Pulmonalklappeninsuffizienz (PI) zugeschrieben [16]. Der Schweregrad der PI ist abhängig von der Pulmonalklappe selbst, ihrer funktionellen Integrität sowie von der diastolischen Nachlast des RV, verursacht durch hypoplastische oder stenotische Pulmonalarterien [30], von der rechtsventrikulären Compliance [31] und von der Ausbildung einer restriktiven bzw. nicht restriktiven Physiologie des RV [6, 16]. Des Weiteren wird die Pulmonalklappeninsuffizienz durch die veränderte Wandkinetik nach RVOT-Rekonstruktion [10, 32] und durch die Infundibulotomie zur Erweiterung des RVOT getriggert [4, 10, 27, 30]. Die Arbeitsgruppe um d'Udekem geht davon aus, dass der infundibulären Region eine besondere Bedeutung zukommt. Die Kontraktion des Infundibulums bis in die späte Diastole soll die Funktionalität der Pulmonalklappe unterstützen [10, 30]. Die PI führt zu einer Volumenbelastung des rechten Ventrikels (Abb. 3) mit abnehmender Ejektionsfraktion (EF) [10, 11] sowie ansteigenden rechtsventrikulären enddiastolischen (RVEDV) und endsystolischen Volumina (RVESV) [9]. Der rechte Ventrikel reagiert mit zunehmender Dilatation [3], deren Ausmaß vom Grad der PI und der Dauer des Rückflusses [33] abhängt. Die Dehnung des RV beeinträchtigt die interventrikuläre Weiterleitung und begünstigt das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien [9, 34] und des plötzlichen Herztodes [34]. Ein Zusammenhang zwischen der RV-Größe und der mittels EKG nachweisbaren kritischen QRS-Verlängerung über 180 ms, einem Indikator für das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien [22], wird angenommen [5, 22, 35]. Nahezu alle betroffenen Patienten weisen einen Rechtsschenkelblock auf [9]. Die RV-Dilatation steht des Weiteren in Verbindung mit verminderter Belastbarkeit [4, 15, 34] und eingeschränkter Vitalkapazität sowie reduzierter Atemreserve [11]. Ein negativer Effekt der rechtsventrikulären Volumenbelastung auf die systolische linksventrikuläre Funktion mit Induktion einer globalen mechanischen linksventrikulären Dyssynchronität wird ebenfalls in Betracht gezogen [36]. Wenn die Volumenbelastung vom RV nicht mehr kompensiert werden kann, kommt es zur rechtsventrikulären Dysfunktion [4]. Die Abwendung der rechtsventrikulären Dysfunktion, verursacht durch die iatrogene PI, bleibt langfristig betrachtet, nach wie vor eine Herausforderung.

#### **1.4 Definition Stammzelle**

Unter Stammzellen versteht man undifferenzierte Zellen mit einem unbegrenzten Selbsterneuerungspotential und der Fähigkeit sich in reife Zellen mit bestimmten morphologischen und funktionellen Eigenschaften differenzieren zu können [37]. Die ideale Stammzelle für kardiovaskuläre Therapieansätze muß genetisch kompatibel und pluripotent sein und das Potential zur kardialen Differenzierung aufweisen. Stammzellen sind nicht nur im adulten Knochenmark zu finden. Neueren Erkenntnissen zufolge sind sie in den unterschiedlichsten Geweben, unter anderem auch in jenen mit geringem Regenerationspotential, wie z.B. im Muskel, im Myokard oder im Gehirn vorhanden und zur gewebespezifischen Regeneration befähigt [38].

#### **1.5 Kardiale Stammzellen**

Die Hinweise auf residente kardiale Stammzellen mit bislang unbekannter Herkunft [39], die die Fähigkeit zur Proliferation [39], Regeneration und Differenzierung in Kardiomyozyten [41] besitzen, widersprechen den veralteten Ansichten, dass das Herz terminal differenziert sei und über kein Regenerationspotential verfüge. Schon 1998 vermerkt die Arbeitsgruppe um Anversa, dass es keinen Hinweis auf terminale Differenzierung in Kardiomyozyten gebe [42]. Von Lin (-) c-kit (POS) Zellen ist bekannt, dass sie im Tiermodell eine Differenzierung in Kardiomyozyten [39] zeigten und zu einer Neuformation von Myokard in der Infarktgrenzzone [40] führten. Quaini et al. berichten 2002, dass nach humaner Herztransplantation Kardiomyozyten des Empfängers im Transplantat gefunden werden konnten [43]. Im Jahr 2003 wurde publiziert, dass nach Knochenmark-Transplantation reichlich Kardiomyozyten, hervorgebracht vom Knochenmark des Spenders, im Empfängerherz nachgewiesen wurden [44]. Sowohl die neuesten Erkenntnisse über die möglichen residenten Stammzellen als auch das zunehmende Wissen über die Stammzellen eröffnen Wege für neue Behandlungsansätze in der regenerativen Medizin.

#### **1.6 Stammzellen in der regenerativen Medizin**

Es gibt mehrere Theorien über die Funktionsweise der Stammzellen. In der Diskussion stehen die Transdifferenzierung der Zellen [38, 45, 46], die Möglichkeit der parakrinen Effekte durch sezernierte Faktoren [47, 38], die Fusionstheorie [38, 46] und die Induktion der Angiogenese [47] oder die direkte Teilnahme der Progenitorzellen an der myokardialen Reparatur [47]. Ein weiterer Aspekt ist die Protektion des Herzmuskels durch die Reduktion der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen infolge einer Myokardschädigung, z.B. nach ischämischem Reperfusionsschaden bei akuter Druckbelastung [48]. Unter den Stammzellen zeichnen sich vor allem die CD34-positiven und CD133-positiven Zellen durch ihr myogenes und angiogenetisches Potential aus.

Die Zellen werden vermutlich aufgrund einer Genaktivierung von SDF-1 (pre-B-cell-growth-stimulating-factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), SCF (stem cell factor) und HGF (hepatocyte growth factor) rekrutiert, so dass ein Homing in das infarzierte Myokard stattfindet [47]. In der Klinik für Herzchirurgie der Universität Rostock wird die autologe CD133-positive Stammzelltransplantation zur Behandlung der chronisch ischämischen Herzerkrankung im Rahmen der aortokoronaren Bypassoperationen seit 2001 durchgeführt [49]. Nach den bislang veröffentlichten, Erfolg versprechenden Resultaten von Kurz- und Langzeituntersuchungen, die den Nachweis für eine Verbesserung der LV-Funktion im Vergleich zur alleinigen Bypassoperation erbrachten [50], wird in naher Zukunft eine prospektive, randomisierte, multizentrische Phase-3-Studie anlaufen, die die Wirksamkeit der autologen CD133-positiven Stammzelltransplantation im Rahmen der chronisch ischämischen Herzerkrankung in Verbindung mit einer aortokoronaren Bypassoperation untersuchen wird.

### **1.7 Stammzellen aus dem Nabelschnurblut**

Die Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (NSB) rücken derzeit zunehmend in den Fokus der medizinischen Forschung, da das Blut unter der Geburt einfach, komplikationslos und schmerzfrei entnommen werden kann. Die Entnahme des Nabelschnurblutes gilt als ethisch unbedenklich [51]. Im letzten Trimenon wandern die Stammzellen über den Blutkreislauf ins Knochenmark. Zum Zeitpunkt der Geburt sind sie im Überfluss im Blutkreislauf zu finden [46], können postpartum entnommen und zur autologen Transplantation verwendet werden. Vom Nabelschnurblut wird berichtet, dass es eine beträchtliche Anzahl primitiver, multipotenter Stammzellen und Progenitorzellen beherbergt [51, 52, 53, 54], die das Potential aufweisen, sowohl hämatopoetische Stammzellen als auch nicht-hämatopoetische Stammzellen hervorzubringen [46, 55, 56]. Das Nabelschnurblut soll zum Zeitpunkt der Geburt circa 1,0% bis 1,5% hämatopoetischer CD34-positiver Stammzellen enthalten [52, 57]. Diese zeichnen sich im Vergleich zu den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks durch eine sehr gute Proliferation und Vermehrbarkeit aus [58, 59, 60] und gelten als alternative Quelle für die stammzellbasierte Therapie [58]. Die Stammzellen des Nabelschnurblutes wurden von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde (FDA) als den Stammzellen des Knochenmarks gleichwertig anerkannt [37]. Das Vorkommen mesenchymaler Stammzellen (MSC) im Nabelschnurblut wird derzeit noch kontrovers diskutiert [59, 61]. In einer Reihe von Arbeiten wurde aufgezeigt, dass die Stammzellen des Nabelschnurblutes nicht-hämatopoetische Zellen wie Nerven-, Endothel- und glatte Muskelzellen sowie Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten [46, 55, 56] hervorbringen. Fuchs et al. berichteten über die Differenzierung isolierter MSC aus frischem NSB des Schafes in Knorpelgewebe [62].

Reinisch et al. stellten zudem fest, dass innerhalb von sieben Wochen eine klinische Quantität von  $100 \times 10^6$  multipotenten MSC unter Beibehaltung des Differenzierungspotentials aus dem NSB generiert werden kann [60]. Ein weiteres Merkmal der Stammzellen aus dem Nabelschnurblut ist ihre immunologische Unreife [63], d.h. dass im Vergleich zu den adulten Stammzellen des Knochenmarks das Risiko für eine Transplantat-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Reaktion; GvHR) um vieles geringer erscheint [58]. Der Vorteil gegenüber den embryonalen Stammzellen liegt, wie bei den Stammzellen des Knochenmarks, darin, dass nach bisherigem Erkenntnistand kein erhöhtes Risiko für die maligne Entartung besteht [54].

### 1.7.1 Therapeutische Einsatzmöglichkeiten der Stammzellen aus dem Nabelschnurblut

Ein Patient mit Fanconi-Anämie erhielt bereits 1988 die erste Transplantation von Nabelschnurblut [64]. Die Stammzellen können allogene und autolog transplantiert werden. Die Stammzellen des NSB finden ihre Anwendung in der allogenen Stammzelltransplantation zur Regeneration des hämatopoetischen Systems nach Chemotherapie von Tumoren [65]. Nachteilig ist die geringe Anzahl hämatopoetischer Stammzellen (HSC), die aus dem Nabelschnurblut (NSB) gewonnen werden kann [66], wodurch sich die bisherige Anwendung vor allem auf die Pädiatrie beschränkte [66]. Jüngste Ergebnisse im Tiermodell zeigten, dass bei direktem Einbringen der Stammzellen in den Knochen ein Bruchteil der Zellmenge, die bei der intravenösen Applikation benötigt wird, für eine erfolgreiche Transplantation ausreicht [67]. Die autologe Transplantation hat sich derzeit noch nicht etabliert und wird aufgrund fehlender klinischer Erfahrungen mit dem Nabelschnurblut skeptisch beurteilt [37]. Dennoch wurden bereits NSB-Banken eingerichtet, wo das Blut für den Eigenbedarf bzw. für allogene Transplantationen kryokonserviert gelagert wird.

### 1.7.2 Nabelschnurblut und kardiovaskuläre Therapie

Das Differenzierungspotential der Stammzellen des Nabelschnurblutes verspricht neue Ansätze für die kardiovaskuläre Reparatur [55, 56]. Erst kürzlich konnten aus dem NSB isolierte mononukleäre Zellen (MNC) erfolgreich zur myokardialen Regeneration und Reparatur eingesetzt werden [52, 53, 57]. CD34-positive Zellen des NSB können in vitro in endotheliale Progenitorzellen differenzieren [68] und durch eine erhöhte Neoangiogenese zur Verbesserung der kardialen Funktion beitragen [57, 69]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Zellen aus dem Nabelschnurblut in das geschädigte Myokard migrieren, dort anwachsen [52, 57] und die Infarktgröße verringern [57].

Von mesenchymalen Stammzellen des NSB wird berichtet, dass sie ein erhöhtes Potential zur Differenzierung in kardiomyozyten-ähnliche Zellen aufweisen [45, 70, 71] und die Fähigkeit besitzen an der Regeneration der Kardiomyozyten teilzunehmen, was in der Therapie angeborener Herzfehler von Nutzen wäre [71]. Bezüglich der humanen immunselektierten CD133-positiven Zellen des NSB wurde bekannt, dass sie endotheliale und kardiomyogene Eigenschaften besitzen und VE-Cadherin, CD146 oder Muskelproteine wie Troponin I und MYCH (myosin heavy chain) in vitro exprimieren können [45]. Kögler et al. berichteten über nicht-hämatopoetische Zellen des NSB, sogenannte unrestricted somatic stem cells (USSCs), die sie in das Peritoneum 56 bis 60 Tage alter präimmuner Schafföten applizierten. Acht Monate nach der Transplantation konnte die Differenzierung dieser Zellen sowohl in Kardiomyozyten als auch in Purkinjefasern nachgewiesen werden, was sie von adulten mesenchymalen Stammzellen unterscheidet [54]. Es konnte gezeigt werden, dass bei Kokultivierung humaner MSC des NSB nach circa 5 Tagen die Hälfte aller Zellen rhythmisch und synchron kontrahierte und sich positiv für kardiales Troponin-I und Connexin 43 anfärbte.

## 1.8 Zielstellung

Bislang fehlen Literaturangaben über experimentelle in-vivo-Modelle, die einerseits die postoperative Situation von Patienten mit korrigierter Fallot'scher Tetralogie nachahmen und andererseits den Effekt der Stammzellbehandlung bei rechtsventrikulärer Volumenbelastung aufzeigen. Das Ziel der Studie war die Beurteilung der Effektivität der intramyokardialen Applikation autologer mononukleärer Zellen des Nabelschnurblutes bei chronischer Volumenbelastung des rechten Ventrikels. Ein weiterer Aspekt war die Entwicklung einer neuen experimentellen Methode zur chirurgischen Induktion einer rechtsventrikulären Volumenbelastung im Schafmodell mit klinischer Relevanz bei korrigierter Fallot'scher Tetralogie.

Wir untersuchten, ob:

- 1.) die intramyokardiale Applikation von autologen mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes sicher und im Therapieansatz bei rechtsventrikulärer Volumenbelastung zur Beeinflussung der rechtsventrikulären Dysfunktion effektiv ist und
- 2.) die chirurgische Induktion einer Pulmonalklappeninsuffizienz durch die Infundibulotomie des rechten Ventrikels und die Implantation einer transanulären Erweiterungsplastik auf den rechtsventrikulären Ausflusstrakt ein geeignetes Modell für die rechtsventrikuläre Volumenbelastung darstellt.

Die Beurteilung der Herzfunktion erfolgte invasiv mit dem Konduktanz-Katheter und nicht-invasiv mit der transthorakalen Echokardiographie. Die hämodynamischen Messungen mit dem Konduktanz-Katheter gaben Aufschluss über den akuten und chronischen Effekt der chirurgisch induzierten Pulmonalklappeninsuffizienz. Die transthorakale Echokardiographie ermöglichte die Einstufung des erzielten Insuffizienzgrades an der Pulmonalklappe. Die makroskopischen und mikroskopischen Untersuchungstechniken wurden zur Evaluation der Effektivität der intramyokardialen Stammzellinjektion und zur Analyse der Kausalität sowie der Plausibilität der Ergebnisse herangezogen. Zum Ausschluss von unerwünschter Gewebekonstruktion durch Stammzellen, z.B. Kalzifikation und Tumorbildung, wurde eine kardiale Computertomographie durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Hardware

| Hardware   | Typ                          | Firma   |
|--|------------------------------|---|
| <i>Monitoring</i>                                |                              |   |
| <b>Pulsoxymetrie</b>                             | Nellcor™ Oximax™ N85         | Tyco Healthcare, Pleasanton, California, USA  |
| <b>Beatmungsgerät</b>                            | Excel 210                    | Ohmeda, Madison, Wisconsin, USA               |
| <b>Elektrokardiographie</b>                      | Sirecust 1261                | Siemens, Erlangen, Deutschland                |
| <i>Hämodynamik</i>                               |                              |   |
| <b>Katheter</b>                                  | Druck-Katheter 5F            | Millar, Houston, Texas, USA                   |
| <b>Katheter</b>                                  | Volumen-Katheter 5F          | CD Leycom, Zoetermeer, Niederlande            |
| <b>Druckaufnehmer</b>                            | Millar MPVS 300              | EMKA Technologies, Paris, Frankreich          |
| <b>Volumenaufnehmer</b>                          | Sigma 5 DF                   | CD Leycom, Zoetermeer, Niederlande            |
| <b>Millar PowerLab data-acquisition Hardware</b> | Type ITF 16                  | EMKA Technologies, Paris, Frankreich          |
| <i>CT / Echokardiographie</i>                    |                              |   |
| <b>Ultraschallgerät</b>                          | Vivid-i                      | GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, USA      |
| <b>Computertomograph</b>                         | Toshiba, Aquilion 32         | Toshiba Medical Systems Corp., Tochigi, Japan |
| <i>Nabelschnurblut</i>                           |                              |   |
| <b>Zentrifuge</b>                                | Multifuge 1 S-R              | Heraeus, Hanau, Deutschland                   |
| <b>FACS-Gerät</b>                                | FACS SCAN flow cytometer     | Becton Dickinson, San Jose, California, USA   |
| <b>Mikroskop</b>                                 | Leica DM IL                  | LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz        |
| <b>10er Objektiv</b>                             | Leica C Plan 10 x / 0,22 PH1 | LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz        |
| <i>Immunhistochemie</i>                          |                              |   |
| <b>Fluoreszenzmikroskop</b>                      | LEICA DMLB                   | LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz        |
| <b>40er Objektiv</b>                             | N PLAN 40 x / 0,65           | LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz        |
| <b>Kamera</b>                                    | LEICA DFC 420 C              | LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz        |

## 2.1.2 Software

| Software                                   | Typ   | Firma  |
|--|---|--|
| <b>Herzfunktionsaufnahme-<br/>software</b> | IOX 1.8.3.20  | EMKA Technologies, Paris, Frankreich             |
| <i>Immunhistochemie</i>                    |   |  |
| <b>Software der Kamera</b>                 | Leica Application Suite Version<br>2.7.1 R1 [Build: 1384] | LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz           |
| <b>Planimetrie</b>                         | Axio Vision Rel 4.5; Axio<br>Vs40 V4.5.0.0                | Carl Zeiss, Hallbergmoos, Deutschland            |
| <b>Bildbearbeitungs-<br/>software</b>      | IM 50, V. 1.20,<br>Leica Release 19                       | LEICA Microsystems, Heerbrugg, Schweiz           |
| <b>Bildbearbeitungs-<br/>software</b>      | Adobe Photoshop CS 8.0.1                                  | Adobe Systems Inc., San Jose, California, USA    |
| <b>Bildbearbeitungs-<br/>software</b>      | Microsoft Office PowerPoint 2003                          | Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA  |
| <i>Statistik</i>                           |   |  |
| <b>SigmaStat</b>                           | Sigma Stat 3.0  | Systat Software, Inc., San Jose, California, USA |
| <b>Sigma Plot</b>                          | Sigma Plot 9.0  | Systat Software, Inc., San Jose, California, USA |
| <b>SPSS Software Packet</b>                | Version 15.0  | SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA                |

## 2.1.3 Zellseparation

| Material  | Firma   |
|---|---|
| <b>Nabelschnurblut</b>  | VITA 34 AG, Leipzig, Deutschland              |
| <b>DNase I</b>  | Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA |
| <b>GIBCO™ Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium</b>               | Invitrogen, Carlsbad, California, USA         |
| <b>Neubauerzählkammer</b>                                       | BRAND, Wertheim, Deutschland                  |
| <b>Trypanblau</b>   | MERCK, Darmstadt, Deutschland                 |
| <b>Pancoll (Dichte: 1,086 g/ml)</b>                             | PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland           |
| <b>Pipetten (Eppendorf)</b>                                     | Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland   |
| <b>Pipettenspitzen für 1000 µl, 100 µl, 10 µl (Cellstar R®)</b> | Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland   |
| <b>Pipettierhilfe (Pipetboy acu)</b>                            | IBS Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland |
| <b>Pipettenspitzen für 25 ml (Cellstar R®)</b>                  | Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland   |
| <b>Reaktionsgefäße 50 ml, 15 ml (Cellstar R®)</b>               | Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland   |
| <b>Reaktionsgefäß 1 ml, 1,5 ml (Cellstar R®)</b>                | Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland   |
| <b>Laminar Luftstrombank (Uniprotect)</b>                       | Ehret, Emmendingen, Deutschland               |

### 2.1.4 FACS-Analyse und Kultivierung

| Material  | Firma   |
|---|---|
| <i>Primäre Antikörper</i><br>CD34 goat polyclonal IgG             | Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA       |
| <i>Sekundäre Antikörper</i><br>donkey anti rabbit Alexa Fluor 488 | Invitrogen, Carlsbad, California, USA         |
| Kulturflasche 75 cm <sup>2</sup>                                  | Greiner, Frickenhausen, Deutschland           |
| Endothelzellmedium (MCDB 131 Medium)                              | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA       |
| AcLDL (Alexa Fluor 488 conjugated)                                | Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA         |
| Inkubator (Heraeus, BBD 6220)                                     | Heraeus, Düsseldorf, Deutschland              |
| Pipetten (Eppendorf)  | Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland   |
| Pipettenspitzen für 1000 µl, 100 µl, 10 µl (Cellstar R®)          | Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland   |
| Pipettenspitzen für 25 ml (Cellstar R®)                           | Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland   |
| Pipettierhilfe (Pipetboy acu)                                     | IBS Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland |
| Laminar Luftstrombank ( Uniprotect)                               | Ehret, Emmendingen, Deutschland               |
| FACS-Röhrchen (Falcon ®)  | Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland     |
| Paraformaldehyd 4%  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland               |

### 2.1.5 Immunhistologie

| Material   | Firma                                      |
|--|--|
| <i>Primäre Antikörper</i><br>CD31-goat polyclonal IgG                | Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA    |
| <i>Sekundäre Antikörper</i><br>Alexa Fluor® 488-donkey anti-goat-IgG | Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA      |
| Peroxidase-Blocking Reagent  | Dako, Glostrup, Dänemark                   |
| Protein Block  | Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark        |
| Antibody Diluent   | Dako, Glostrup, Dänemark                   |
| TOPRO 3  | Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA      |
| FluorSave™ Reagent   | Calbiochem, San Diego, California, USA     |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung                                       | Zentralapotheke der Universität Rostock    |
| Zitronensäure-Puffer   | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA    |
| Objektträger   | Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland |
| Deckgläschen   | Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland |
| Erhitzer und Rührgerät (MR 3001 K)                                   | Heidolph, Schwabach, Deutschland           |

## 2.1.6 OP-Materialien

| <b>OP-Materialien</b>                             | <b>Firma</b>   |
|---|--|
| <b>Atemfilter (Hygrobac S)</b>                    | Tyco Healthcare, Pleasanton, California, USA                                     |
| <b>CO<sub>2</sub>-Filter-Line</b>                 | Medtronic, Düsseldorf, Deutschland   |
| <b>Endotrachealtubus 8.0</b>                      | Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland  |
| <b>Zentralvenenkatheter</b>                       | ARROW, Reading, Pennsylvania, USA  |
| <b>Thermodilutionskatheter 7.5F</b>               | ARROW, Reading, Pennsylvania, USA  |
| <b>Arterieller Katheter für A. radialis (20G)</b> | Vygon, Aachen, Deutschland   |
| <b>Absaugkatheter CH16, CH14</b>                  | Dahlhausen, Köln, Deutschland  |
| <b>Säge, Supercut 723628</b>                      | C. & E. Fein GmbH, Schwäbisch Gmünd-Bargau, Deutschland                          |
| <b>Fogarty-Okklusions-Katheter</b>                | Edward Lifescience LLC, Irvine, California, USA                                  |
| <b>Combitrans Monitoring Set 1-fach</b>           | B. Braun, Melsungen, Deutschland   |
| <b>Combitrans Monitoring Set venös</b>            | B. Braun, Melsungen, Deutschland   |
| <b>Combitrans MS Basis arteriell</b>              | B. Braun, Melsungen, Deutschland   |
| <b>Braunüle MT Luer Lock</b>                      | B. Braun, Melsungen, Deutschland   |
| <b>Dauerkanüle</b>                                | Baxter Healthcare, McGaw Park, Illinois, USA                                     |
| <b>Blutentnahmesystem</b>                         | Monovette, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland                                       |
| <b>Gefäßprothese</b>                              | Gelweave woven vascular prothesis, Vacutec Ltd., Terumo, Refrewshire, Schottland |
| <b>Skalpell Präzisa Plus</b>                      | Dahlhausen, Köln, Deutschland  |
| <b>Omnican Feindosierung 30G x 12</b>             | B. Braun, Melsungen, Deutschland   |
| <b>Prolene 5/0-C1</b>                             | Ethicon, Norderstedt, Deutschland  |
| <b>Vicryl 2,0</b>                                 | Ethicon, Norderstedt, Deutschland  |
| <b>Silberspray</b>                                | Heiland, HLZ Logistik GmbH & Co KG, Gallin, Deutschland                          |
| <b>Absaugschlauch</b>                             | Extrudan®, Birkerød, Dänemark  |
| <b>Saugkopf-Link Yankauer</b>                     | Pennine Health Care, Derby, United Kingdom                                       |
| <b>Einmalspritze, Luer, 5 ml, 10 ml, 20 ml</b>    | B. Braun, Melsungen, Deutschland   |
| <b>Sterican 19G x 1¼</b>                          | B. Braun, Melsungen, Deutschland   |
| <b>Sterican 19G x 2</b>                           | B. Braun, Melsungen, Deutschland   |
| <b>Sterican 19G x 1 ¼</b>                         | B. Braun, Melsungen, Deutschland   |
| <b>Sterican 22G</b>                               | B. Braun, Melsungen, Deutschland   |

### 2.1.7 Medikamente

| Wirkstoff           | Handelsname                              | Firma                                     |
|---------------------|--|---|
| Doramectin          | Dectomax® Injektionslösung               | Pfizer, Zürich, Schweiz                   |
| Enrofloxacin        | Baytril® 5%                              | Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland      |
| Flunixin-Meglumin   | Flunidol®                                | cp-pharma, Burgdorf, Deutschland          |
| Xylazin             | Rompun 2%                                | Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland      |
| Ketamin             | Ketamin 10%                              | Bela-Pharm, Vechta, Deutschland           |
| Diazepam            | Diazepam-ratiopharm® 10 Injektionslösung | Ratiopharm, Ulm, Deutschland              |
| Propofol            | Propofol Lipuro 2%®                      | B. Braun, Melsungen, Deutschland          |
| Isofluran           | Isofluran Delta-Select                   | Delta Select, Pfullingen, Deutschland     |
| Pancuronium         | Pancuronium Delta Select®                | Delta Select, Pfullingen, Deutschland     |
| Fentanyl            | Fentanyl®-Janssen 0,5 mg                 | Janssen Pharmaceutica, Neuss, Deutschland |
| Dexamethason        | Dexa-Ratiopharm 4 mg Injektionslösung    | Ratiopharm, Ulm, Deutschland              |
| Kaliumchlorid       | Kaliumchlorid 7,45%                      | B. Braun, Melsungen, Deutschland          |
| 0,9% Natriumchlorid |  | B. Braun, Melsungen, Deutschland          |
| 10% Natriumchlorid  |  | B. Braun, Melsungen, Deutschland          |
| HES                 | Infukoll HES 6%                          | Serumwerk Bernburg, Deutschland           |
| Iod                 | Braunoderm®                              | B. Braun, Melsungen, Deutschland          |
| Dobutamin           | Dobutamin-ratiopharm® 250 mg / 50 ml     | Ratiopharm, Ulm, Deutschland              |
| Tierfutter          | Kraffutter                               | Leikra, Leipzig, Deutschland              |
| Darbopoetin-α       | Aranesp®                                 | Amgen Switzerland AG, Zug, Schweiz        |
| Penicillin          |  | PAA Laboratories, Linz, Österreich        |
| Streptomycin        |  | PAA Laboratories, Linz, Österreich        |
| Amphotericin        |  | PAA Laboratories, Linz, Österreich        |

### 2.2 Versuchstiere

In der experimentellen Herzchirurgie sind Schafe aufgrund der Ähnlichkeit mit der humanen Physiologie und Anatomie sowie der guten Verfügbarkeit als geeignete Spezies anerkannt. Die Tierversuche wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes (TierschG § 7, 8, 8a, 8b, 9, 9a, zuletzt geändert am 18. Dezember 2007; BGBl. I S. 3001; 2008, 47) durchgeführt. Der Antrag für die Durchführung der Tierversuche wurde beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern eingereicht und von der Tierschutzkommission genehmigt (LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-007/07).

### **2.3 Haltungsbedingungen**

Die Tiere wurden ab dem Beginn der Versuche bis zum 28. Tag postoperativ in einer geschlossenen Stallung (Universität Rostock, Institut für Experimentelle Chirurgie) mit freiem Zugang zu Wasser und Heu gehalten. Einmal täglich erfolgte die Zufütterung von Kraftfutter und Hafer. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere mit 0,2 mg/kg Körpergewicht (KGW) Doramectin, einem Antiparasitikum, geimpft. Eine tägliche Visite bei den Tieren ermöglichte die Beurteilung des aktuellen Gesundheitszustandes. Nach diesem intensiven Beobachtungszeitraum wurden die Tiere, bis zur Durchführung der kardialen Computertomographie, auf eine Grünfläche ausgelagert (Universität Rostock, Tierversuchsanlage) und die Untersuchung der Tiere wurde auf zweimal pro Woche beschränkt. Am Operationstag wurden die Atmung, die Herzfrequenz, die rektale Temperatur und das Gewicht des Tieres dokumentiert. An den ersten 10 postoperativen Tagen fanden tägliche Untersuchungen der Tiere statt. Diese konzentrierten sich auf die Beurteilung von Atmung, Puls, Temperatur, dem Fress- und Trinkverhalten, der allgemeinen Aktivität und dem Gruppenverhalten, der Ausscheidung, der Auskultation von Lunge und Herz und der Wundheilung. Die am Operationstag begonnene Analgesie mit Flunixin-Meglumin wurde über 3 bis 5 Tage beibehalten und das Antibiotikum Enrofloxacin über 7 Tage verabreicht.

### **2.4 Versuchsablauf**

Als Versuchstiere wurden 4 Monate alte Hausschafe beiderlei Geschlechts verwendet. Die Tiere (n=20; männlich:weiblich = 10:10) wurden auf zwei Gruppen (n=10; männlich:weiblich = 5:5) aufgeteilt. Die Zugehörigkeit zur Zellgruppe wurde durch die Entnahme des Nabelschnurblutes unter der Geburt festgelegt. Die Zellgruppe ( $41,1 \pm 5,2$  kg) erhielt eine intramyokardiale Injektion autologer mononukleärer Zellen, die aus dem Nabelschnurblut isoliert wurden, und der Kontrollgruppe ( $37,86 \pm 4,85$  kg) wurde das Zellkulturmedium IMDM intramyokardial appliziert. Der zeitliche Rahmen der Studie war auf drei Monate festgesetzt (Abb. 6). Jedes Tier wurde zwei Operationen unterzogen. In dem ersten Eingriff wurde, durch die Induktion der Pulmonalklappeninsuffizienz und die Erweiterung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (RVOT), die Voraussetzung für eine rechtsventrikuläre Volumenbelastung geschaffen. Die Aufzeichnungen der Druck-Volumen-Kurven nach Frank-Starling mit dem Konduktanz-Katheter wurden zur Validierung der akuten Pulmonalklappeninsuffizienz (PI) herangezogen. Unmittelbar danach wurden der Zellgruppe die Stammzellen bzw. der Kontrollgruppe das Zellmedium IMDM intramyokardial in die freie Wand des rechten Ventrikels (RV) injiziert. Nach 3 Monaten wurde die zweite Operation durchgeführt. Die hämodynamischen Messungen in Ruhe und unter medikamentös induziertem Stress mit Dobutamin wurden aufgenommen, um die Effekte der mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut auf die rechtsventrikuläre Funktion im Modell der chronischen Volumenbelastung einzuschätzen.

Nach der Explantation der Herzen erfolgten eine makroskopische Beurteilung der Herzen und die histologische Auswertung des Herzgewebes. In der postoperativen Beobachtungsphase erfolgte zusätzlich 6 Wochen postoperativ eine transthorakale Echokardiographie, um die rechtsventrikuläre Funktion sowie den Insuffizienzgrad der Pulmonalklappe zu beurteilen. Zum Ausschluss unerwünschter Gewebeformationen wie bspw. Kalzifikation oder Tumorformation, wurde 10 bis 12 Wochen nach der ersten Operation eine kardiale Computertomographie durchgeführt.

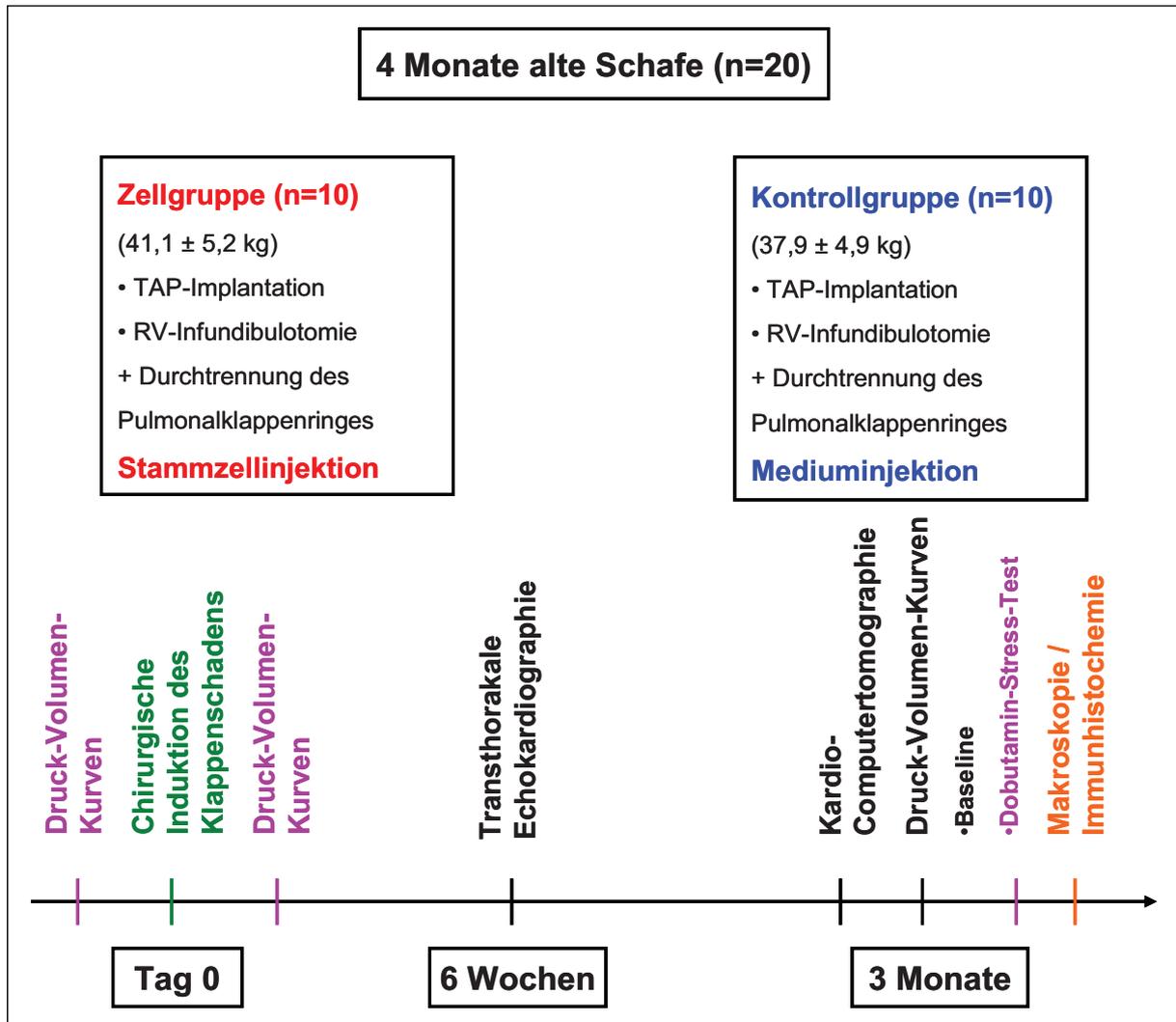
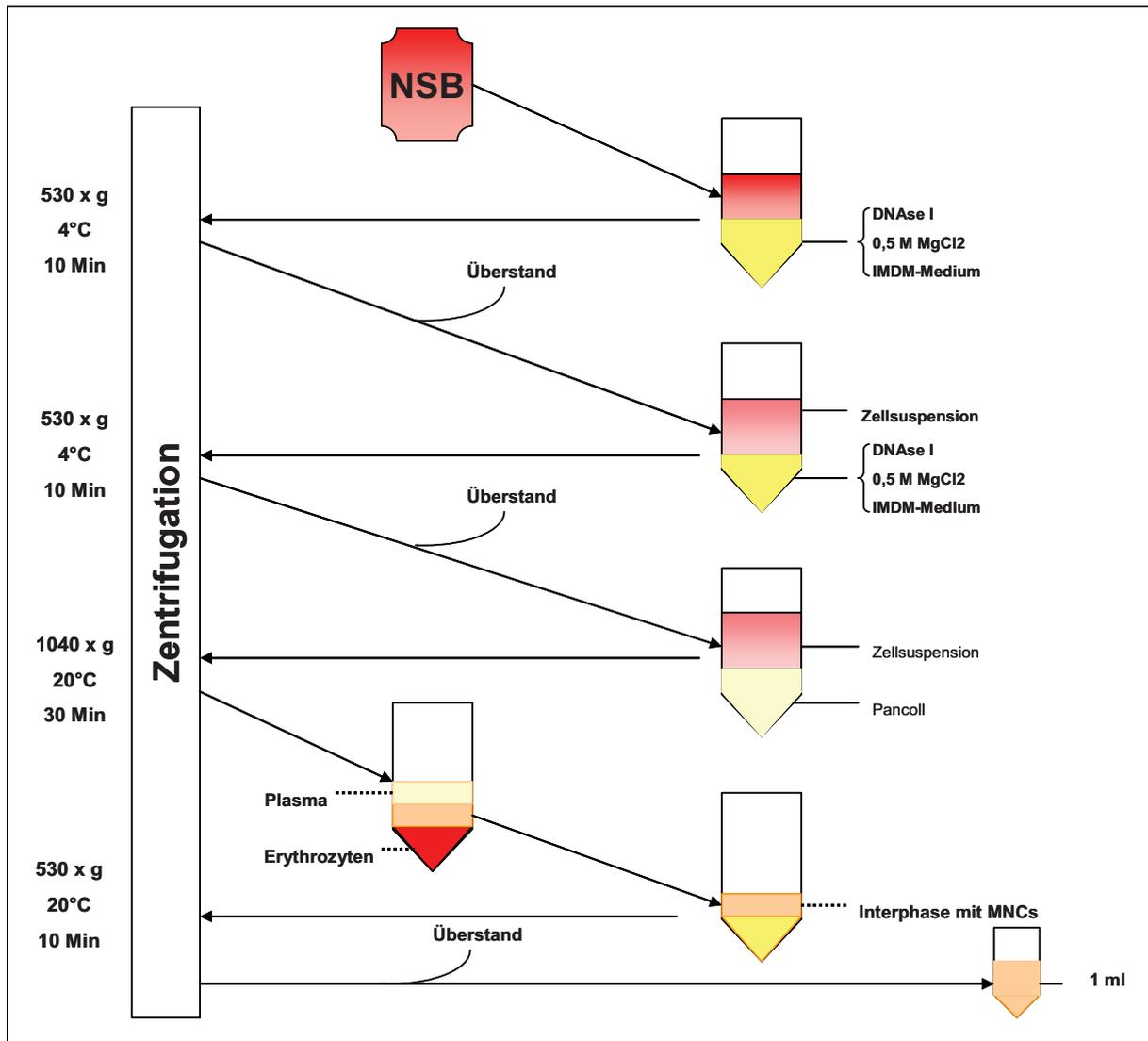


Abb. 6: Das experimentelle Konzept und der zeitliche Rahmen der Studie PV-Loop: Druck-Volumen-Kurven, RV: rechter Ventrikel, TAP: transanuläre Erweiterungsplastik

## 2.5 Entnahme des Nabelschnurblutes

Das Nabelschnurblut wurde durch die Firma VITA 34 (VITA 34 AG, Leipzig, Deutschland) von dem jeweiligen Schaf der Zellgruppe unter der Geburt gewonnen sowie kryokonserviert und für die Studie zur Verfügung gestellt. Nach der Entnahme des Nabelschnurblutes wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) zugefügt, und die Proben wurden in einem Flüssigstickstofftank bei einer Temperatur von -141°C gelagert.

## 2.6 Isolation der mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut



**Abb. 7:** Isolierung der mononukleären Zellen (MNC) aus dem Nabelschnurblut (NSB) nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation

Nach dem Auftauen des Nabelschnurblutes (NSB) auf Eis und bei Raumtemperatur (RT) fand die Aufreinigung des Blutes in zwei konsequenten Waschvorgängen statt. DNase I und 0,5 M Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) wurden dazu jeweils in einem 50 ml Tube vorgelegt und das NSB bzw. die Zellsuspension hinzugefügt. Nach der Zugabe des Zellkulturmediums IMDM wurde zentrifugiert. Das Verhältnis der DNase I zum NSB betrug 1:1 im ersten und 4:1 im zweiten Waschgang, und das Verhältnis von MgCl<sub>2</sub> zum NSB betrug in beiden Waschschritten 0,03:1. Die Vitalitätsbestimmung der Zellen erfolgte in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 zur Zellsuspension. Die Separation der mononukleären Zellen aus der Zellsuspension erfolgte mit Pancoll nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation. Die Interphase (Abb. 7), welche die mononukleären Zellen enthielt, wurde aufgenommen und nach dem Zusatz von 500 µl DNase I und dem Medium IMDM erneut einem Waschgang zugeführt.

Nach Abnahme des Überstandes wurden die definitive Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer ermittelt, die Zellsuspension bis zur 1 ml Graduierung mit Medium aufgefüllt und das Material bis zur intrakardialen Injektion bei 4°C auf Eis gelagert.

### 2.6.1 FACS-Analyse (Fluorescence-activated cell sorting)

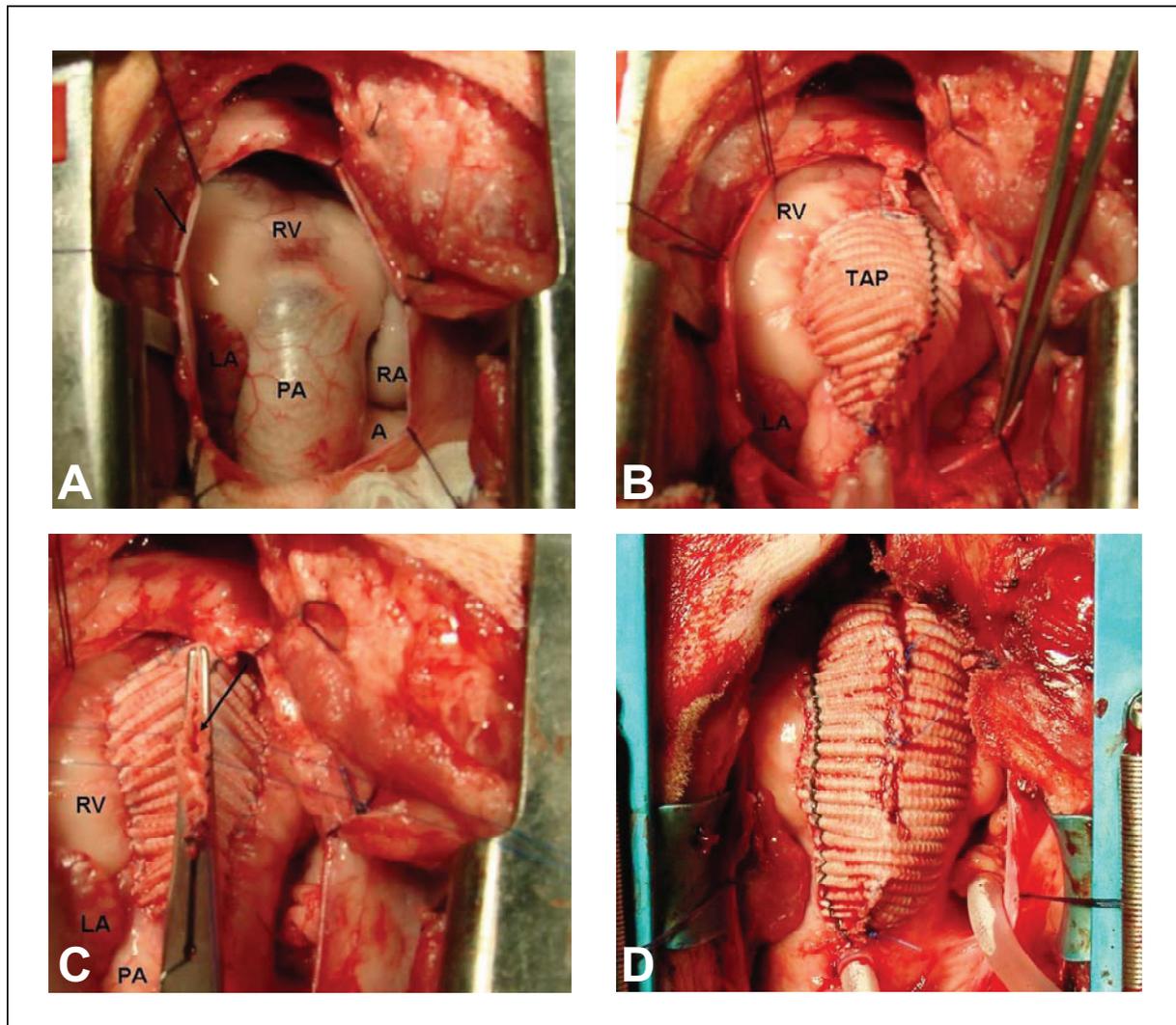
Zur Quantifizierung der CD34-Antigenexpression innerhalb der Fraktion der mononukleären Zellen wurde im Anschluss an die Isolierung eine FACS-Analyse durchgeführt. CD34 wird von hämatopoetischen Stammzellen, endothelialen Progenitorzellen, Satellitenzellen und embryonalen Fibroblasten gebildet und kann als Marker zur Charakterisierung dieser Zellen dienen [73, 74]. Eine Anzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen wurde aufbereitet und bei  $1000 \times g$  über 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) wurden 10 µl des primären CD34-Antikörpers zugegeben und bei 4°C für 20 Minuten inkubiert. Der Negativkontrolle wurde kein primärer Antikörper zugefügt. Nach dem Auswaschen des primären nichtgebundenen Antikörpers durch Spülen mit PBS und der Zentrifugation bei  $1000 \times g$  über 5 Minuten, wurden 1,5 µl des sekundären Antikörpers zugegeben und über 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des freien Anteils des sekundären Antikörpers durch weitere Waschvorgänge wurde das Zellpellet in 300 µl PBS resuspendiert und 4%-iges Paraformaldehyd (PFA) zugegeben. Die Probe wurde in einem FACS-Röhrchen bei 4°C bis zur Analyse verwahrt.

### 2.6.2 Kultivierung der mononukleären Zellen

Nach der Isolierung der mononukleären Zellen, wie oben beschrieben, wurden die Zellen resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt, der das Endothelzellmedium MCDB 131 beigemischt wurde. Das Medium wurde durch die Zugabe von Erythropoetin (50 mU/ml), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Amphotericin (2,5 µg/ml) ergänzt. Die Zellen wurden bei 38,5°C in befeuchteter Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5% inkubiert. Drei Tage nach dem Transfer wurde das Medium komplett ausgetauscht und anschließend regelmäßig 2 bis 3 mal pro Woche gewechselt.

### 2.6.3 AcLDL-Färbung

Acetyliertes Low-Density-Lipoprotein (AcLDL) wird, aufgrund der Fähigkeit der Zellen, diese Substanz aufzunehmen, routinemäßig zur Identifizierung von Endothelzellen in der primären Kultur verwendet [75]. Nach 14 Tagen in der Kultur erfolgte die AcLDL-Färbung entsprechend den Empfehlungen des Herstellers [76]. 10 bis 15 µg/ml fluoreszierendes AcLDL wurde dem Medium zugefügt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das AcLDL durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt, und die fluoreszierenden Zellen wurden unter dem Mikroskop fotografiert.



**Abb. 8:** Operationstechnik des neuen Modells zur Induktion einer rechtsventrikulären Volumenbelastung durch Herbeiführen einer Pulmonalklappeninsuffizienz. Ansicht auf das Herz bei eröffnetem Perikard (A) und auf den RVOT mit aufgebrachter Erweiterungsplastik (B). Die eröffnete Erweiterungsplastik wurde nach der Induktion des Klappenschadens (C) wieder verschlossen (D). A: Aorta, LA: linkes Atrium, LV: linker Ventrikel, PA: Pulmonalarterie, RA: rechtes Atrium, RV: rechter Ventrikel, TAP: transannuläre Erweiterungsplastik

### 2.7 Das neue Modell der chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung

Das experimentelle Modell der chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung, das die hämodynamischen Verhältnisse nach der chirurgischen Korrektur der Fallot'schen Tetralogie nachahmt, umfasst die Implantation der transannulären Erweiterungsplastik und die Zerstörung der Pulmonalklappe im rechtsventrikulären Ausflusstrakt (Abb. 8). Zur Freipräparation des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (RVOT) wurde eine links-anteriore Thorakotomie im 5. bis 6. Interkostalraum (ICR) durchgeführt (Abb. 8A).

Eine transanuläre Erweiterungsplastik wurde vom Infundibulum bis zum Hauptstamm der Pulmonalarterie auf den RVOT aufgebracht, so dass sie 2 cm unterhalb und oberhalb des Pulmonalklappenringes mit kontinuierlicher Polypropylen-Naht 5/0 aufgenäht werden konnte (Abb. 8B). Anschließend erfolgten die Inzision des Anulus sowie die Zerstörung der Pulmonalklappe über eine longitudinale Eröffnung der Erweiterungsplastik (Abb. 7C). Der Anulus wurde über eine Infundibulotomie, ohne extrakorporale Zirkulation, durchtrennt [72].

## **2.8 Anästhesie und perioperatives Management**

Die Tiere wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn bzw. vor dem operativen Eingriff in Nahrungskarenz mit freiem Zugang zu Wasser gehalten. Am Versuchstag erfolgte die antibiotische Prophylaxe mit 5 mg/kg Körpergewicht (KGW) Enrofloxacin intramuskulär sowie die perioperative Analgesie mit 2,2 mg/kg KGW Flunixin-Meglumin subkutan. Die Tiere wurden durch die intramuskuläre Injektion von 0,1 bis 0,5 mg/kg KGW Xylazin sowie 10 bis 20 mg/kg KGW Ketamin 10% prämediziert. Über die Punktion der V. Jugularis externa sinistra oder dextra konnte der zentralvenöse Zugang gelegt werden, über den zusätzlich 0,125 mg/kg KGW Diazepam appliziert wurden. Unter Pulsoxymetrie zur Kontrolle der peripheren Sauerstoffsättigung und der Bereitschaft zur Intubation wurde das Tier in den Operationssaal des Institutes für Experimentelle Chirurgie verbracht. Nach erfolgreicher Präoxygenierung über circa 3 Minuten wurde das Tier, unter der Bedarfsmedikation von 1 mg/kg KGW Propofol, orotracheal intubiert. Nach dem Anschluss an die maschinelle Beatmung erfolgte die Inhalationsnarkose mit 1,5% bis 2,5% Isofluran im Atemgemisch. Weiterhin wurden präoperativ 0,005 bis 0,01 mg/kg KGW des Muskelrelaxans Pancuronium und 0,0075 mg/kg KGW des Opioids Fentanyl intravenös (i.v.) verabreicht. Zusätzlich erfolgte beim ersten Eingriff in beiden Gruppen die i.v. Gabe 0,1 mg/kg KGW Dexamethason, um das Risiko einer myokardialen Inflammation, provoziert durch die operative Manipulation und die multiplen intramyokardialen Injektionen, zu minimieren [77]. Die Anästhesie wurde bis zur Beendigung der Versuche fortgeführt. Nach der ersten Operation wurde das Tier in einer speziellen Aufwacheinrichtung in Bauchlage gehalten und mittels Pulsoxymetrie überwacht. Die sichere Extubation erfolgte nach dem Einsetzen der Spontanatmung. Erst nach Erlangen des vollen Bewusstseins wurde das Tier wieder in die Stallung transportiert. Nach Beendigung des zweiten operativen Eingriffs, am Ende der Versuche, wurde das Tier durch eine intravenöse Injektion von 7,45%-igem Kalium unter der Narkose euthanasiert, und das Herz wurde zur weiteren Untersuchung explantiert.

## 2.9 Monitoring

Das kontinuierliche Monitoring (Abb. 9) während der Operation umfasste die Ableitung eines Elektrokardiogramms (EKG), die Kapnometrie und die Pulsoxymetrie. Der arterielle und zentral venöse Druck wurden über einen arteriellen Katheter sowie einen Zentralvenenkatheter (ZVK) abgeleitet. Die periphere arterielle Sauerstoffsättigung und das endexpiratorische Kohlendioxid (EtCO<sub>2</sub>) wurden während des Versuches innerhalb der physiologischen Grenzen gehalten.

| Monitoring                  | Messung                                      | Indikator   |
|-----------------------------|--|---|
| <b>EKG</b>                  | Herzströme                                   | Herzrhythmus, Herzfrequenz, Ischämiezeichen                     |
| <b>Pulsoxymetrie</b>        | Arterielle Sauerstoffsättigung (96-98%)      | Pumpfunktion des Herzens, Gasaustausch in der Lunge             |
| <b>Kapnometrie</b>          | Endexpiratorisches Kohlendioxid (35-45 mmHg) | Gasaustausch in der Lunge, Suffizienz der Beatmung, Zirkulation |
| <b>ZVK</b>                  | Zentralvenöser Druck (2-10 mmHg)             | Füllungsdruck des RV  |
| <b>Arterieller Katheter</b> | systemischer Druck (120/80 mmHg)             | Pumpfunktion des Herzens, peripherer Gefäßwiderstand            |

**Abb. 9:** Übersicht über das Monitoring unter der Operation. EKG: Elektrokardiogramm, RV: rechter Ventrikel, ZVK: Zentralvenenkatheter

## 2.10 Erster Operationstag

### 2.10.1 Präparation des Herzens

Das narkotisierte Tier wurde in Rechtsseitenlage fixiert. Eine Magensonde wurde platziert. Die linke Thoraxseite wurde für die Thorakotomie rasiert, chirurgisch desinfiziert und abgedeckt. Die Freilegung und Eröffnung des Perikards erfolgte nach einer links-anterioren Thorakotomie im 5. bzw. 6. ICR (Abb. 10A). Anschließend wurden Perikardhaltenähte angebracht. In Vorbereitung auf die hämodynamischen Messungen wurden Tabaksbeutelnähte um die Zugangswege am rechten Atrium, für den Swan-Ganz-Katheter sowie den Fogarty-Katheter und an der A. pulmonalis für den Konduktanz-Katheter angelegt (Abb. 10B und C).

### 2.10.2 Swan-Ganz-Katheter-Messungen

Das Einbringen des Swan-Ganz-Katheter erfolgte über eine Stichinzision im rechten Atrium. Mit dem Swan-Ganz-Katheter wurden die Drücke im rechten Ventrikel und in der Pulmonalarterie gemessen und die Referenzwerte für das Herzzeitvolumen (HZV) nach der Thermodilutionsmethode ermittelt [78]. Bei der Thermodilutionsmethode werden 10 ml 0°C kalte isotonische 0,9% NaCl-Lösung als Bolusinjektion in den proximalen Schenkel des ZVK appliziert. Über den sogenannten Thermistor des Swan-Ganz-Katheters wird distal des Injektionsortes die Temperatur kontinuierlich gemessen.

Das Herzzeitvolumen wird aus dem Integral der Temperaturänderung bestimmt. Drei aufeinanderfolgende Messungen wurden gemittelt, um den Referenzwert für die Volumenmessung mit dem Konduktanz-Katheter zu erhalten. Die simultane Aufzeichnung der Herzfrequenz (HF) ermöglichte die Berechnung des Schlagvolumens (SV) als Quotient aus dem Herzzeitvolumen und der Herzfrequenz.

Formel zur Berechnung des Schlagvolumens:

$$SV = HZV / HF$$

### 2.10.3 Konduktanz-Katheter-Messungen

Über eine Stichinzision in den Hauptstamm der Pulmonalarterie konnten die Konduktanz-Katheter (5F) zur Druck- und Volumenmessung in den rechten Ventrikel eingeführt werden (Abb. 10B und C). Der Druckkatheter wurde mit einem Aufnehmer für die Registrierung des Druckes und der Volumenkatheter mit einem Aufnehmer zur Analyse des Volumens konnektiert. Beide Aufnehmer sind Komponenten der Millar PowerLab data-aquisition Hardware. Für die Echtzeitverarbeitung der Signale diente das Softwareprogramm IOX. Alle Parameter wurden online aufgenommen und für Offline-Analysen gespeichert. Vor Beginn der Messung wurde die Leitfähigkeit des Blutes, der sogenannte  $\rho$ -Wert, mit 5 ml Blut des jeweiligen Tieres bestimmt. Nach der Optimierung der Katheterposition wurde das Schlagvolumen über die Konduktanz-Katheter ermittelt. Hiermit war die Berechnung des benötigten Korrekturfaktors  $\alpha$  möglich [72, 79].

Formel zur Berechnung des Korrekturfaktors  $\alpha$ :

$$\alpha = SV (PAK) / SV (PV-Loop)$$

Für die native Ruhemessung wurden die Herzzyklen über zwei Minuten registriert. Mit der Konduktanz-Katheter-Messung konnten das enddiastolische Volumen (EDV), der enddiastolische Druck (EDP), das Schlagvolumen (SV), das Herzzeitvolumen (HZV), das endsystolische Volumen (ESV), der endsystolische Druck (ESP), der maximale Druck ( $P_{max}$ ), die maximale Geschwindigkeit des Druckanstiegs ( $dp/dt_{max}$ ) und des Druckabfalls ( $dp/dt_{min}$ ) sowie die Ejektionsfraktion (EF) ermittelt werden [72, 79]. Um eine ausreichende Genauigkeit der Messung zu gewährleisten, wurde die Parallelkonduktanz in Apnoe ermittelt. Zur Bestimmung der Parallelkonduktanz wurde eine 10 ml Bolusinjektion hypertoner 10%-iger NaCl-Lösung in das rechte Atrium über den ZVK appliziert [80] und gegebenenfalls wiederholt, um die Richtigkeit der gemessenen Werte zu abzusichern.

#### 2.10.4 Vorlastreduktionsmanöver

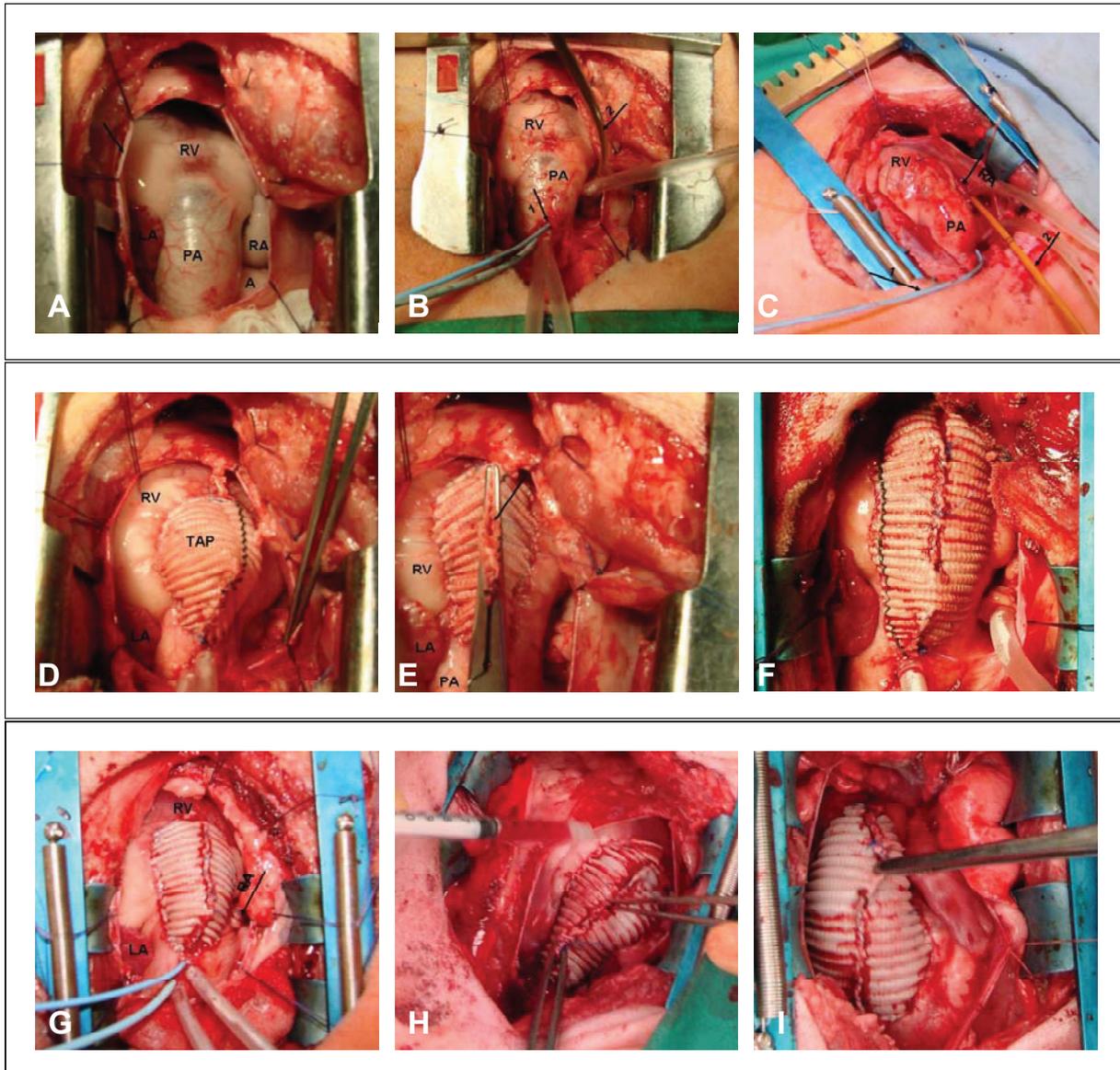
Für die Aufnahme standardisierter Vorlastreduktionsmanöver wurde ein 23 mm Ballonkatheter über den Zugangsweg im rechten Atrium in die untere Hohlvene eingebracht [77]. Eine Serie von drei Vena-cava-Okklusionsmessungen wurde unter Apnoe aufgezeichnet, um die Parameter für die vorlastabhängige Schlagvolumenarbeit (PRSW), für die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR), für die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR) sowie die Druckwerte bei einem definierten Volumen von 40 ml (P40) und 20 ml (P20) und die Volumenwerte bei einem definierten Druck von 40 mmHg (V40) und 20 mmHg (V20) zu bestimmen. Die EDPVR gibt Auskunft über die myokardiale Steifigkeit und die ESPVR ist ein Indikator für die myokardiale Kontraktilität. Der Konduktanz-Katheter verblieb für weitere Messungen zunächst intrakardial.

#### 2.10.5 Chirurgische Induktion des Klappenschadens

Mit einer kontinuierlichen 5/0 Polypropylen-Naht, beginnend vom Infundibulum bis zum Hauptstamm der Pulmonalarterie in der Region circa 2 cm unterhalb bis 2 cm oberhalb des Pulmonalklappenringes, wurde die Erweiterungsplastik auf den RVOT aufgebracht (Abb. 10D). Die Erweiterungsplastik wurde longitudinal eingeschnitten. Über die eröffnete Erweiterungsplastik erfolgten die Inzision des RVOT mit einem Stichskalpell sowie die Durchtrennung des Pulmonalklappenringes über die Infundibulotomie mit einer Schere. Das direkte Abklemmen der eröffneten Erweiterungsplastik nach der Inzision des RVOT sollte Blutverlust vermeiden (Abb. 10E).

#### 2.10.6 Validierung der akuten Pulmonalklappeninsuffizienz

Nach dem Verschließen der Erweiterungsplastik wurden hämodynamische Messungen mit dem Konduktanz-Katheter durchgeführt, um die akute Pulmonalklappeninsuffizienz zu validieren. Vorlastreduktionsmanöver wurden direkt postoperativ nicht aufgezeichnet, um eine akute kardiale Dekompensation zu vermeiden [79].



**Abb. 10:** Experimentelles Vorgehen am ersten Operationstag. Aufsicht auf das eröffnete Perikard (Pfeil) mit Darstellung des RV und des RVOT (A). Über eine Stichinzision in der A. pulmonalis wurde der Konduktanz-Katheter (B; Pfeil 1) für hämodynamische Messungen eingebracht. Für die Vorlastreduktionsmanöver wurde ein Ballonkatheter (C; Pfeil 2) in die untere Hohlvene eingeführt. Das Aufnähen der TAP erfolgte in der Region circa 2 cm unterhalb bis 2 cm oberhalb des Pulmonalklappenringes (D). Über die eröffnete Erweiterungsplastik erfolgte die Inzision des Anulus sowie die Zerstörung der Pulmonalklappe. Direktes Abklemmen (E; Pfeil) sollte bei eröffneter TAP Blutverlust vermeiden. Nach dem Verschließen der Erweiterungsplastik (F) wurden direkt postoperativ hämodynamische Messungen zur Validierung der akuten Pulmonalklappeninsuffizienz durchgeführt (G). Die intramyokardialen Injektionen der autologen mononukleären Zellen erfolgten in die freie Wand des RV in zwei Reihen um die TAP in Richtung der Herzbasis (H). Zustand nach Beendigung der operativen Intervention. A: Aorta; LA: linkes Atrium, LV: linker Ventrikel, PA: Pulmonalarterie, RA: rechtes Atrium, RV: rechter Ventrikel, TAP: transanuläre Erweiterungsplastik

### 2.10.7 Zellinjektion

Mit einer selbstkonstruierten Spritze (Abb. 11) wurden die autologen mononukleären Zellen in einem Volumen von 1 ml bzw. 1 ml des Zellmediums IMDM intramyokardial in die freie Wand des RV injiziert (Abb. 10H). Es wurden 10 Injektionen mit einem Volumen von 0,1 ml in zwei Reihen an die untere Grenze der transanulären Erweiterungsplastik gesetzt. Die erste Reihe wurde in unmittelbarer Nähe zur Erweiterungsplastik appliziert und die zweite in einer Distanz von 1 cm. Nach jeder Transplantation bzw. Mediuminjektion wurde der Injektionskanal mit einem Wattestäbchen komprimiert, um das Herauslaufen der Zellsuspension bzw. des Mediums aus der Punktionsstelle zu verhindern.



**Abb. 11:** Modifikation der 1 ml Spritze durch den Aufsatz eines kleinen Anteils einer 22G Kanüle (Pfeil). Die selbstkonstruierte Spritze sollte die Perforation des Ventrikels während der Injektion verhindern.

### 2.10.8 Beendigung der ersten Operation

Am Ende des operativen Eingriffs wurden die Perikardränder adaptiert und eine Drainage in den Thoraxraum eingelegt. Die Muskelnnaht, die subkutane Hautnaht und der Wundverschluss erfolgten mit resorbierbarem Vicryl 2/0-Faden. Die Drainage konnte nach manueller Blähung der Lungen mit Erhöhung des intrathorakalen Druckes unter kontinuierlichem Sog entfernt werden. Die Wunde wurde desinfiziert und mit Silberspray besprüht. Der ZVK wurde bis zum Ende des ersten postoperativen Tages belassen.

## 2.11 Reoperation nach 3 Monaten

Das narkotisierte Tier wurde in Rückenlage fixiert und eine Magensonde wurde platziert. Der Thorax wurde für die mediane, longitudinale Sternotomie rasiert, chirurgisch desinfiziert und abgedeckt. Zur medianen Sternotomie wurde eine Säge verwendet. Das Perikard wurde freipräpariert, eröffnet und mit Haltenähten befestigt. Die Adhäsionen zwischen Perikard und Herz wurden vorsichtig gelöst und die V. cava superior und die A. pulmonalis dargestellt. Die Tabaksbeutelnähte um die Katheterzugangswege in der V. cava superior für den Swan-Ganz-Katheter sowie den Fogarty-Katheter und in der A. pulmonalis für die Konduktanz-Katheter wurden gesetzt. Der Swan-Ganz-Katheter wurde über die V. cava superior und das rechte Atrium in den rechten Ventrikel und den Hauptstamm der Pulmonalarterie eingeführt, so dass die Druckverhältnisse im rechten Ventrikel und in der Pulmonalarterie sowie das Herzzeitvolumen ermittelt werden konnten. Anschließend erfolgten das Einführen des Konduktanz-Katheters über die Pulmonalarterie in den rechten Ventrikel und die Aufnahme der Ruhemessung zur rechtsventrikulären Funktion sowie die Ermittlung der Parallelkonduktanz. Der Fogarty-Katheter wurde über die V. cava superior in die V. cava inferior zur Aufzeichnung der Vorlastreduktionsmanöver eingebracht.

### 2.11.1 Dobutamin-Stress-Messungen

Die hämodynamischen Messungen nach 3 Monaten wurden um einen Belastungstest, den Dobutamin-Stress-Test, erweitert. Dobutamin wirkt direkt auf die kardialen  $\beta_1$ -Rezeptoren mit positiv inotropem, chronotropem und dromotropem Effekt. Der myokardiale Sauerstoffbedarf steigt, während das Sauerstoffangebot aufgrund der verkürzten diastolischen Phase des Herzzyklus abnimmt. Eine kardiale Belastungssituation, ähnlich der Fahrradergometrie, wird simuliert. Dem Tier wird über einen Perfusor Dobutamin in steigender Dosis, beginnend mit 3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  bis 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , infundiert. Als Zielgröße der zu erreichenden Belastbarkeit dient die maximale Herzfrequenz, theoretisch errechnet durch 220 minus Alter, von uns festgelegt auf 200 bis 210 Herzschläge pro Minute. Bei erreichter Zielfrequenz wurden der Herzzyklus über 2 Minuten mittels Konduktanz-Katheter aufgezeichnet und die Werte der Vorlastreduktionsmanöver registriert.

### 2.11.2 Euthanasie und Explantation

Nach erfolgten hämodynamischen Messungen wurde der Herzstillstand durch die intravenöse Gabe von 7,45%-igem Kalium herbeigeführt, wonach das Herz unverzüglich explantiert wurde. Die Explantation erfolgte nach Durchtrennung der großen Gefäßstämme, indem der Truncus pulmonalis, der Arcus aortae, die obere und die untere Hohlvene sowie die vier einmündenden Vv. pulmonales in Höhe der perikardialen Umschlagsfalten abgetrennt wurden.

Das Herz wurde nach Prinzipien der Amputatversorgung auf Eis gelagert und in das Institut für Pathologie (Universität Rostock) zur makroskopischen Beurteilung übersandt. Der Thorax wurde verschlossen und der Tierkadaver wurde dem Landesveterinäramt übergeben.

## **2.12 Analyse der laborchemischen Parameter**

Die Bestimmung der Laborparameter erfolgte unmittelbar vor der ersten Operation, am 1. und 7. Tag postoperativ sowie zu Beginn der zweiten Operation. Am jeweiligen Operationstag und am 1. postoperativen Tag wurde die Blutprobe über den liegenden Zentralvenenkatheter entnommen. Zur postoperativen Blutentnahme wurde die V. jugularis externa dextra oder sinistra punktiert.

### **2.12.1 Herzspezifische Enzyme**

Als Indikatoren der myokardialen Schädigung wurden die Enzyme Kreatinkinase (CK) und Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Zu den vier Messzeitpunkten wurde hierfür Serum- und EDTA-Blut verwendet.

### **2.12.2 Routinelabor**

Die Labordiagnostik wurde durch die Bestimmung der Elektrolyte wie Natrium, Kalium und Calcium, das kleine Blutbild mit Hb, MCV, Hk, Leukozyten, die Leberenzyme ALAT, ASAT,  $\gamma$ -GT, AP und Lipase sowie die Gerinnungsparameter Thrombozyten, PTT, Quick und die Retentionswerte Kreatinin und Harnstoff ergänzt. Die Analyse der Blutproben erfolgte mit freundlicher Unterstützung des Institutes für Klinische Chemie und Labordiagnostik der Universität Rostock.

## **2.13 Transthorakale Echokardiographie**

Die transthorakale Echokardiographie wurde 6 Wochen postoperativ durchgeführt. Der untersuchende Kardiologe war bezüglich der Verteilung der Tiere in die Zell- bzw. Kontrollgruppe verblindet. Die Untersuchung der Tiere erfolgte in Rechtsseitenlage. Die Fragestellung beinhaltete die Beurteilung der Rechtsherzfunktion und die Bestimmung des Insuffizienzgrades der Pulmonalklappe. Die Pulmonalklappeninsuffizienz wurde in 4 Kategorien unterteilt: Grad 0 (keine), Grad 1 (minimal), Grad 2 (mild), Grad 3 (mäßig) und Grad 4 (schwer). Weiterhin wurden die rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion (RVEF), die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) sowie das rechtsventrikuläre enddiastolische (RVEDV) und das endsystolische (RVESV) Volumen ermittelt.

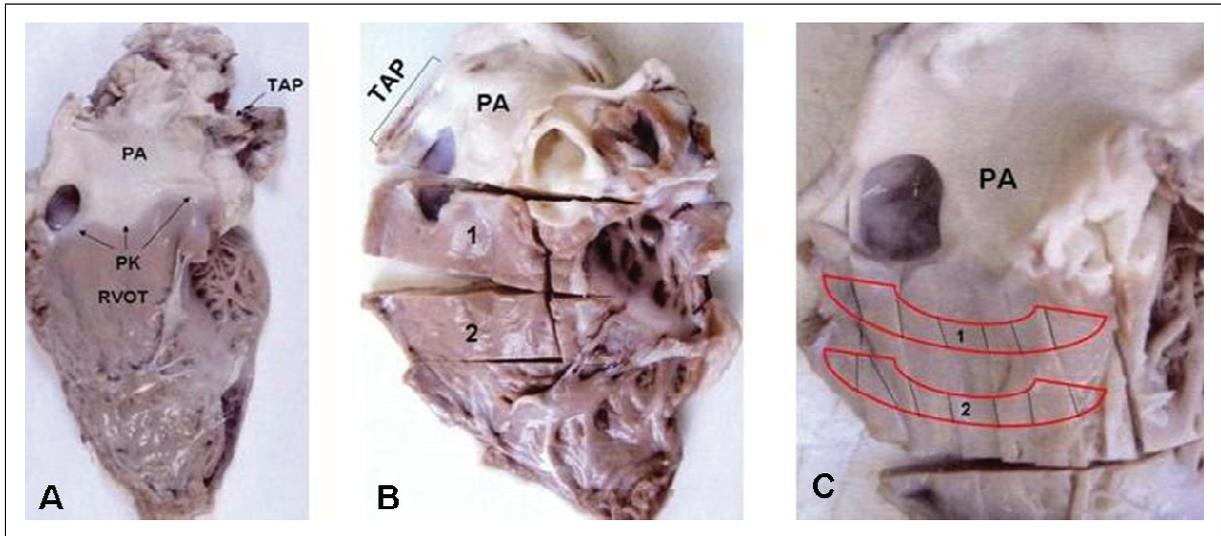
## **2.14 Kardiale Computertomographie**

Die kardiale Computertomographie (CT) der Tiere erfolgte zwischen der 10. bis 12. postoperativen Woche. Der verblindete Radiologe wurde mit der Fragestellung nach ungewollten Gewebeformationen wie Kalzifikationen oder Tumorformationen im Myokard konsultiert. Für die Untersuchung wurden die Tiere mit 10 bis 20 mg/kg KGW Ketamin 10% und 0,1 bis 0,5 mg/kg KGW Xylazin prämediziert und ein venöser Zugang über die V. jugularis externa angelegt. Während des Transportes zum Uniklinikum Rostock wurde die periphere arterielle Sättigung kontrolliert und Sauerstoff nasal zugeführt. Im CT-Saal wurde das Tier durch die intravenöse Gabe von 2,5 ml Ketamin und 0,1 ml Xylazin in eine Kurznarkose gelegt, so dass in Absprache mit den Tierärzten keine Intubationspflicht bestand. Das CT wurde in Linksseitenlage gefahren. Die Bildgebung erfolgte unter Kontrastmittelgabe, EKG-getriggert, jedoch ohne Apnoe-Phasen, da kein adäquates portables Beatmungsgerätes für Großtiere zur Verfügung stand. Bei klinischen Zeichen einer beeinträchtigten Nierenfunktion durch das Kontrastmittel wären eine Volumensubstitution mit isotonischer Kochsalzlösung sowie die Gabe eines Diuretikums erfolgt.

## **2.15 Makroskopische und mikroskopische Beurteilung des Herzens**

### **2.15.1 Vorbereitung der Schnitte**

Die explantierten Herzen wurden dem Institut für Pathologie (Universität Rostock) zugesandt. Die postmortale Präparation des Herzens erfolgte mit besonderem Fokus auf die makroskopische Beurteilung der Pulmonalklappe, des RVOT und der morphologisch sichtbaren Anzeichen von Folgen der rechtsventrikulären Volumenbelastung (Abb. 14A). Die Befunde an den Herzen wurden fotodokumentiert. Im Anschluss an die makroskopische Begutachtung erfolgte die immunhistochemische Analyse des Gewebes. Aus dem rechten Ventrikel (RV) wurden, in dem Bereich der Stammzelltransplantation, zwei Querstreifen herausgeschnitten (Abb. 12B), von denen Gewebelöcke angefertigt wurden (Abb. 12C). Die Gewebelöcke wurden in der Region direkt an der Erweiterungsplastik und in 1 cm Entfernung zur Erweiterungsplastik entnommen. Die Gewebeprobe wurden in 4%-igem gepufferten Formalin fixiert und nach dem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol in Paraffin eingebettet. Von den Präparaten wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt.



**Abb. 12:** Rechter Ventrikel mit Ansicht des RVOT und der Pulmonalklappe (A). Exzision der Querstreifen (B) direkt unterhalb der Erweiterungsplastik (1) und in 1 cm Entfernung (2); in diesem Bereich waren die intramyokardialen Injektionen erfolgt. Von den Gewebelöcken (C) wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt und histologisch ausgewertet. PA: Pulmonalarterie, PK: Pulmonalklappe, RVOT: rechtsventrikulärer Ausflusstrakt, TAP: transanuläre Erweiterungsplastik

### 2.15.2 Histologische Auswertung

Die histologischen Untersuchungen umfassten die Hematoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) zur Beurteilung der Integrität des Myokards, die Goldner-Färbung zur Beurteilung der Fibrose (Grünfärbung von Bindegewebe) sowie die Färbemethode nach Kossa zur Detektion von Kalzifizierung (Anfärbung der kalkhaltigen Areale tiefschwarz).

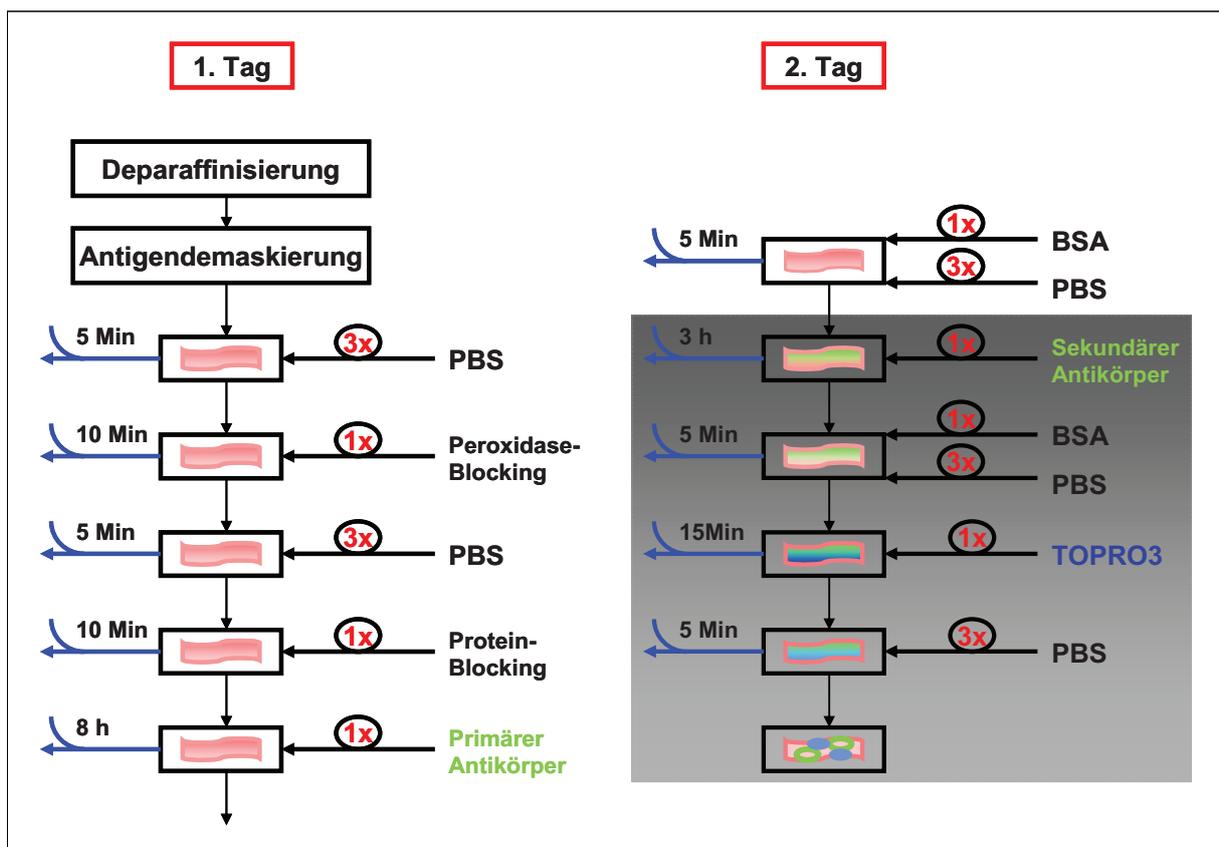
### 2.15.3 Auswertung der Goldner-Färbung

Die Schnitte wurden in 400-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet und fotodokumentiert. Für ein Versuchstier wurden 8 Schnitte unterschiedlicher Lokalisation analysiert. Für einen Schnitt wurden 10 zufällige Gesichtsfelder (0,216 mm<sup>2</sup>) ausgewertet. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der interstitiellen Fibrose mit Hilfe der Planimetrie. Die Fotodokumentation und die Auswertung der Planimetrie erfolgten, durch eine Kodierung der Schnitte in der Pathologie, die erst nach der Auswertung mit der Nummer des Versuchstieres abgeglichen wurde, verblindet.

### 2.15.4 CD31-Immunfluoreszenz-Färbung

Die CD31-Färbung erfolgt nach dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz, d.h. der Primäntikörper bindet an das Antigen und wird im zweiten Schritt mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gekoppelt und somit unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. CD31 (PECAM-1) ist ein Antigen, welches von Endothelzellen großer und kleiner Gefäße exprimiert wird [81].

Um den Nachweis einer Anbindung des Antigens an eine Zelle zu erbringen, wurden die Zellkerne ebenfalls mit dem TOPRO 3 markiert. In zwei weiteren Zwischenschritten erfolgte die Hemmung der Aktivität der Peroxidasen und Proteinasen, um eine möglichst hohe Spezifität des Signals zu gewährleisten. Die Aufarbeitung der Schnitte (Abb. 13) begann mit der Deparaffinisierung in Xylol, gefolgt von der absteigenden Alkoholreihe, der Antigendemaskierung mit Zitronensäure-Puffer (pH-Wert: 6,0) und den Waschschrinen, die zur Vermeidung unspezifischer Bindung erforderlich waren. Der erste Färbetag endete mit dem Auftragen des primären Antikörpers CD31 in einer Verdünnung von 1:25, der dann bei 4°C über Nacht inkubierte. Dem Abwaschen des nichtgebundenen Primärantikörpers folgte das Auftragen des sekundären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:500, der zunächst für 2 Stunden bei 37°C und dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Mit dem Auftragen des sekundären Antikörpers ist das Arbeiten in Dunkelheit für die Qualität des Signals essentiell. Nach Entfernung des nichtgebundenen sekundären Antikörpers, konnte die Kernfärbung mit TOPRO 3 erfolgen. Abschließend erfolgte die Versiegelung des Schnittes zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes.



**Abb. 13:** Schematische Darstellung der CD31-Färbung. BSA: Bovine Serum Albumin, PBS: Phosphat-gepufferte-Salzlösung

### 2.15.5 Auswertung der CD31- Immunfluoreszenz-Färbung

Die Schnitte wurden in 400-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop analysiert. Für ein Versuchstier wurden 4 Schnitte ausgewertet. Zwei Schnitte zeigten das Herzgewebe aus der Region direkt an der Erweiterungsplastik und zwei Schnitte das Herzgewebe in 1 cm Entfernung zur Erweiterungsplastik. Es wurden pro Schnitt 20 zufällige Gesichtsfelder (0,216 mm<sup>2</sup>) beurteilt und die querangeschnittenen Kapillaren ausgezählt. Die Auszählung erfolgte, durch eine Kodierung der Schnitte in der Pathologie, die erst nach der Auswertung mit der Nummer des Versuchstieres abgeglichen wurde, verblindet.

### 2.16 Statistische Analysen

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS. Für den Gruppenvergleich (n=10) wurde der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Für zeit -und methodenabhängige Vergleiche zwischen den prä- und postoperativen Werten innerhalb der Gruppe wurde zunächst der Friedman-Test ausgeführt. Bei einem statistisch signifikanten p-Wert <0,05 wurde der paarweise Wilcoxon-Test angefügt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Ergebnisse werden in der Arbeit als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Transplantation der isolierten mononukleären Zellen

In der Stammzellgruppe konnten durchschnittlich  $8,2 \pm 6,3 \times 10^7$  autologe mononukleäre Zellen erfolgreich in das Myokard des rechten Ventrikels transplantiert werden (Tabelle 1). In der Kontrollgruppe wurde in den entsprechenden Regionen eine Injektion mit dem Zellkulturmedium IMDM durchgeführt. Komplikationen wie Myokardperforationen, -blutungen und myokardiale Ödeme traten nach der intramyokardialen Injektion nicht auf.

**Tabelle 1:** Angabe des Blutvolumens, aus dem die mononukleären Zellen (MNC) zur autologen Transplantation gewonnen wurden. Die injizierten mononukleären Zellen sind für das Injektatvolumen von 1 ml angegeben.

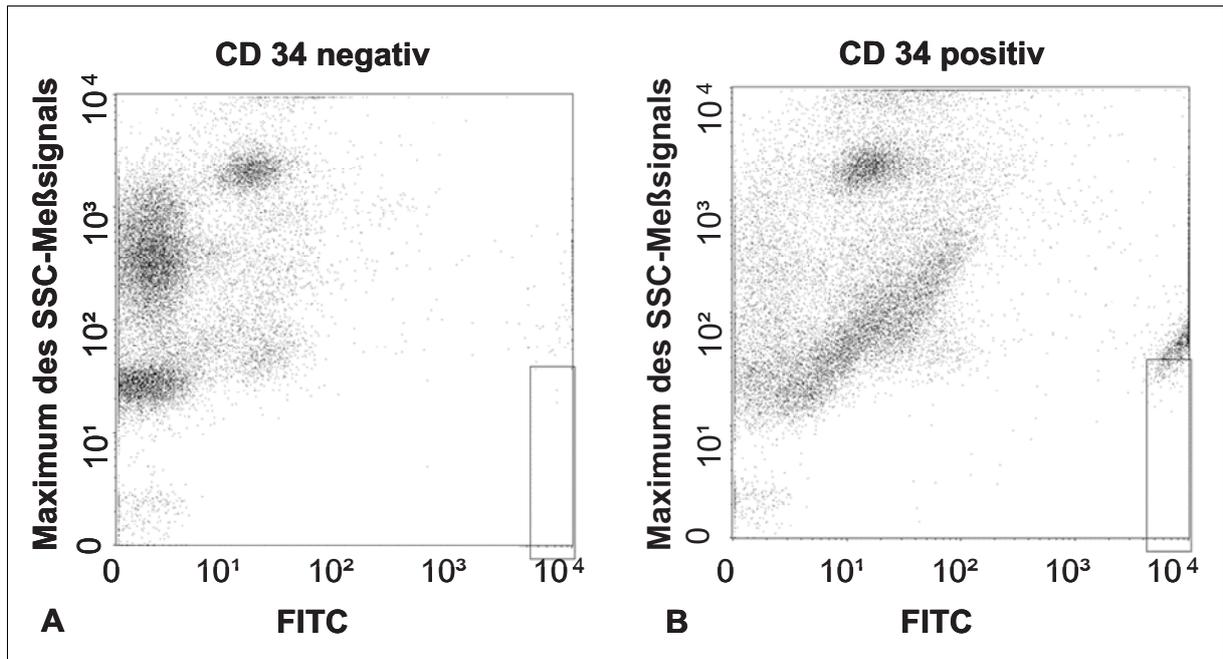
| Versuchstier der Zellgruppe | Blutvolumen in ml              | MNC x $10^7$ pro injiziertem ml |
|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <b>1</b>                    | 80                             | 7,3                             |
| <b>2</b>                    | 40                             | 23,0                            |
| <b>3</b>                    | 40                             | 9,2                             |
| <b>4</b>                    | 60                             | 5,7                             |
| <b>5</b>                    | 35                             | 12,3                            |
| <b>6</b>                    | 80                             | 3,1                             |
| <b>7</b>                    | 45                             | 3,4                             |
| <b>8</b>                    | 35                             | 0,416                           |
| <b>9</b>                    | 80                             | 9,2                             |
| <b>10</b>                   | 45                             | 8,6                             |
|                             | <b><math>54 \pm 6,1</math></b> | <b><math>8,2 \pm 6,3</math></b> |

##### 3.1.1 FACS-Analyse

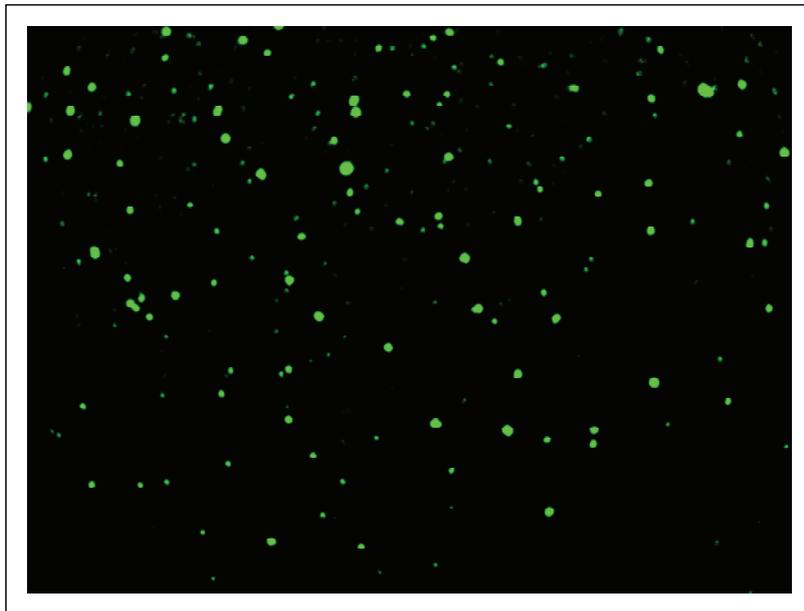
Die FACS-Analyse (Abb. 14) ergab  $1,2 \pm 0,2\%$  CD34-positive Zellen innerhalb der isolierten mononukleären Zellfraktion des Endprodukts.

##### 3.1.2 AcLDL-Färbung

Die Charakterisierung der primitiven mononukleären Zellen, nach 14-tägiger Kultivierung in dem spezifischem Endothelzellmedium MCDB 131, mittels AcLDL-Test ergab ein positives Testergebnis mit AcLDL-positiven Endothelzellen (Abb. 15).



**Abb. 14:** Repräsentative FACS-Analyse für das CD34-Antigen. Die Negativkontrolle ohne Inkubation mit dem primären Antikörper (A) im Vergleich zur FACS-Analyse mit positivem CD34 Nachweis innerhalb des Rahmens (B). CD: Cluster of Differentiation, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, SSC: Side Scatter



**Abb. 15:** Positive AcLDL-Färbung. Die grün-fluoreszierenden Zellen sind AcLDL-positive Endothelzellen.

### 3.2 Mortalität und Morbidität

Zwei Tiere verstarben vor Versuchsbeginn (Abb. 16). Ein Tier musste mit dem Verdacht auf eine Meningitis euthanasiert werden. Der ausführliche Obduktionsbericht liegt dem Anhang bei. Das zweite Tier verstarb am ersten Versuchstag auf dem Transport zum Institut für experimentelle Chirurgie an einem Myokardinfarkt mit Herz-Kreislaufversagen.

Bei den Versuchstieren verursachte der chirurgische Eingriff keine Mortalität. Intraoperativ traten keine chirurgischen Komplikationen auf. Im postoperativen Beobachtungszeitraum verstarben drei Tiere. Aus der Zellgruppe starben zwei Tiere. Das eine Tier verstarb am 11. postoperativen Tag aufgrund einer schweren Pneumonie und das zweite Tier in der 11. postoperativen Woche auf dem Transport zum CT. Eine Aspiration nach Prämedikation im nicht-intubierten Zustand schien hier die wahrscheinlichste Todesursache. Das Tier der Kontrollgruppe verstarb in der 2. postoperativen Woche an einem serösen Perikarderguss, der wahrscheinlich eine Perikardtamponade bedingte. Im weiteren postoperativen Verlauf traten (Tabelle 2) Wundinfektionen, aufgrund der Stallhaltung, Bronchitis, Pneumonie, Fress- und Trinkunlust, Schwäche, Perikarderguss ohne hämodynamische Relevanz sowie erhöhte Temperaturen bis Fieber auf.

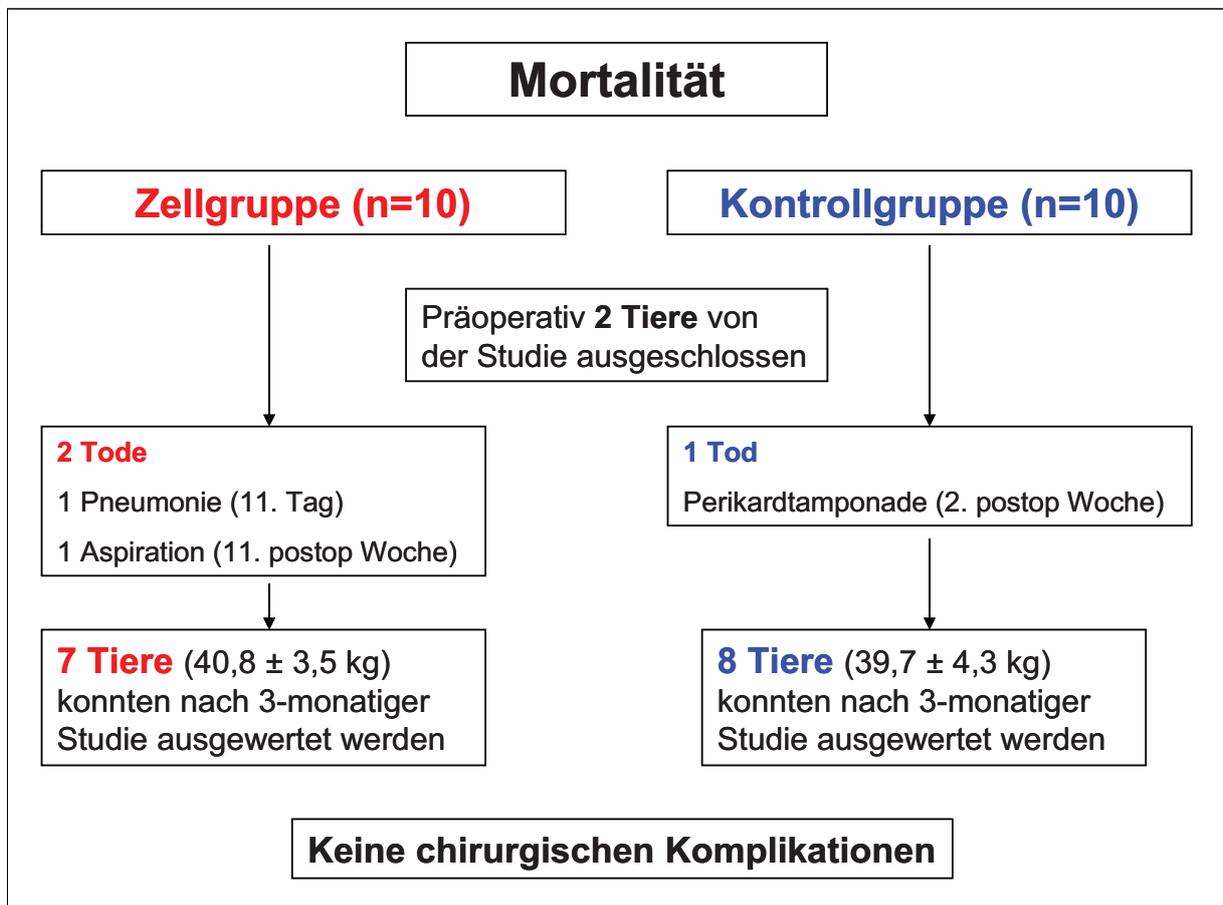


Abb. 16: Mortalität der Versuchstiere innerhalb der 3 monatigen Studie

**Tabelle 2:** Gründe für die Morbidität unter den Versuchstieren innerhalb der ersten vier postoperativen Wochen

| <b>Morbidität</b>                    | <b>Häufigkeit</b> | <b>Prozent</b> |
|--------------------------------------|-------------------|----------------|
| <b>Wundinfektion</b>                 | 4                 | 22,2%          |
| <b>Bronchitis</b>                    | 7                 | 38,8%          |
| <b>Pneumonie</b>                     | 5                 | 27,7%          |
| <b>Fress- und Trinkunlust</b>        | 4                 | 22,2%          |
| <b>Schwäche</b>                      | 10                | 55,5%          |
| <b>Perikarderguss</b>                | 2                 | 11,1%          |
| <b>Erhöhte Temperatur bis 40,5°C</b> | 15                | 83,3%          |
| <b>Fieber ab 40,5°C</b>              | 6                 | 33,3%          |

Normaltemperatur des Schafes: 38,5 bis 39,5°C

### 3.3 Erfolg des chirurgischen Modells

Der chirurgische Eingriff ermöglichte das Setzen einer standardisierten akuten Pulmonalklappeninsuffizienz bei allen Tieren, welche durch die Konduktanz-Katheter-Messungen (siehe unten) intraoperativ und durch die Echokardiographie postoperativ bestätigt wurde.

### 3.4 Swan-Ganz-Katheter-Messungen

Die direkte Messung des systolischen und des diastolischen Druckes im rechten Ventrikel (RV) sowie der systolischen und diastolischen Werte des pulmonalarteriellen Druckes erfolgte sowohl bei der ersten Operation, Messzeitpunkt 1, als auch bei der zweiten Operation, Messzeitpunkt 2, mit dem Swan-Ganz-Katheter. An den zwei Messzeitpunkten ergab sich im Vergleich zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied. Der Vergleich innerhalb der Gruppe zwischen den beiden Messzeitpunkten ergab sowohl in der Zellgruppe als auch in der Kontrollgruppe einen signifikanten Abfall des systolischen RV-Druckes (Zellgruppe:  $p=0,028$ ; Kontrollgruppe:  $p=0,034$ ), des systolischen pulmonalarteriellen Druckes (Zellgruppe:  $p=0,018$ ; Kontrollgruppe:  $p=0,012$ ) sowie des diastolischen pulmonalarteriellen Druckes (Zellgruppe:  $p=0,018$ ; Kontrollgruppe:  $p=0,027$ ). Für den diastolischen RV-Druck konnte in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

**Tabelle 3:** Übersicht über die mit dem Swan-Ganz-Katheter gewonnenen Werte.

| <i>Druck [mmHg]</i>         | <i>Zellgruppe</i> | <i>Kontrollgruppe</i> | <i>p<sub>2</sub></i> |
|-----------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>RV<sub>sys</sub> 1</b>   | 22,1 ± 1,4        | 21,0 ± 2,0            | 0,666                |
| <b>RV<sub>sys</sub> 2</b>   | 15,4 ± 0,7        | 14,3 ± 1,1            | 0,463                |
| <b>p<sub>1</sub></b>        | <b>0,028</b>      | <b>0,034</b>          |                      |
| <b>RV<sub>diast</sub> 1</b> | 6,4 ± 1,3         | 7,0 ± 1,3             | 0,796                |
| <b>RV<sub>diast</sub> 2</b> | 4,1 ± 0,6         | 5,3 ± 0,9             | 0,536                |
| <b>p<sub>1</sub></b>        | n.s.              | n.s.                  |                      |
| <b>PA<sub>sys</sub> 1</b>   | 20,9 ± 0,9        | 19,2 ± 1,5            | 0,605                |
| <b>PA<sub>sys</sub> 2</b>   | 11,9 ± 0,5        | 13,9 ± 1,4            | 0,536                |
| <b>p<sub>1</sub></b>        | <b>0,018</b>      | <b>0,012</b>          |                      |
| <b>PA<sub>diast</sub> 1</b> | 13,0 ± 1,0        | 12,0 ± 1,6            | 0,796                |
| <b>PA<sub>diast</sub> 2</b> | 6,4 ± 0,4         | 7,1 ± 0,7             | 0,694                |
| <b>p<sub>1</sub></b>        | <b>0,018</b>      | <b>0,027</b>          |                      |

Der Wert  $p_1$  gibt Auskunft über den Vergleich innerhalb der Gruppe zwischen den beiden Messzeitpunkten und der Wert  $p_2$  vergleicht jeweils am Messzeitpunkt 1 und am Messzeitpunkt 2 die beiden Gruppen zueinander. Der Messzeitpunkt 1 (beide Gruppen: n=9) umfasst die präoperativen Werte und der Messzeitpunkt 2 (Zellgruppe: n=7; Kontrollgruppe: n=8) die Werte, die am Ende der 3 monatigen Studie ermittelt wurden. n.s.: nicht signifikant, PA: Pulmonalarterie, RV: rechter Ventrikel

### 3.5 Konduktanz-Katheter-Messungen

#### 3.5.1 Parameter zur Auswertung der hämodynamischen Messungen

Die Untersuchung mit dem Konduktanz-Katheter ermöglichte es, den Effekt der RVOT-Inzision und der Implantation der transanulären Erweiterungsplastik auf die rechtsventrikuläre Funktion zu beurteilen. Die nachfolgende Tabelle 4 verdeutlicht die hämodynamischen Parameter, die zur Auswertung der Rechtsherzfunktion herangezogen wurden. Für die hämodynamischen Messungen können vier Messzeitpunkte angegeben werden. Der präoperative Messzeitpunkt 1 wurde vor dem Setzen des Klappenschadens und der frühe postoperative Messzeitpunkt 2 wurde unmittelbar nach dem Setzen des Klappenschadens aufgenommen. Die Messzeitpunkte 3 und 4 beziehen sich auf die Werte, die am Ende der 3 monatigen Studie ermittelt wurden, wobei Messzeitpunkt 3 die Ruhemessungen und Messzeitpunkt 4 die Dobutamin-Stress-Messungen beschreibt.

**Tabelle 4:** Parameter zur Beurteilung der myokardialen Funktion

| Herzfunktion             | Ruhemessung / Dobutamin          |                         |  |                                 |                         |                               |
|--------------------------|----------------------------------|-------------------------|--|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Systolisch               | <b>P<sub>max</sub></b><br>[mmHg] | <b>ESP</b><br>[mmHg]    | <b>dp/dt<sub>max</sub></b><br>[mmHg/s] | <b>ESV</b><br>[ml]              | <b>EF</b><br>[%]        | <b>HZV</b><br>[ml/min]        |
| Diastolisch              | <b>EDP</b><br>[mmHg]             | <b>EDV</b><br>[ml]      | <b>dp/dt<sub>min</sub></b><br>[mmHg/s] |                                 |                         |                               |
| Vorlastreduktionsmanöver | <b>PRSW</b><br>[ml x mmHg]       | <b>Eed</b><br>[mmHg/ml] | <b>P<sub>40</sub></b><br>[mmHg]        | <b>P<sub>20</sub></b><br>[mmHg] | <b>Ees</b><br>[mmHg/ml] | <b>V<sub>20</sub></b><br>[ml] |

### 3.5.2 Präoperative Messungen der rechtsventrikulären Herzfunktion

(Messzeitpunkt 1)

Vor dem Setzen des Klappenschadens und der Implantation der Erweiterungsplastik ergaben die Konduktanz-Katheter-Messungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der beiden experimentellen Gruppen (dp/dt<sub>max</sub>: p=0,59, dp/dt<sub>min</sub>: p=0,59, EDV: p=0,23, ESV und EF: p=0,63)

**Tabelle 5:** Darstellung der präoperativen systolischen rechtsventrikulären Funktion am Messzeitpunkt 1

| Systolische Funktion  |                                  |                      |  |                    |                  |                       |                   |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------|--|--------------------|------------------|-----------------------|-------------------|
|                       | <b>P<sub>max</sub></b><br>[mmHg] | <b>ESP</b><br>[mmHg] | <b>dp/dt<sub>max</sub></b><br>[mmHg/s] | <b>ESV</b><br>[ml] | <b>EF</b><br>[%] | <b>HZV</b><br>[l/min] | <b>SV</b><br>[ml] |
| <b>Zellgruppe</b>     | 26,8 ± 1,4                       | 19,2 ± 1,1           | 439,2 ± 35,8                           | 14,5 ± 2,5         | 75,4 ± 3,4       | 3,8 ± 0,1             | 42,7 ± 2,0        |
| <b>Kontrollgruppe</b> | 26,9 ± 1,7                       | 20,4 ± 1,3           | 415,1 ± 25,2                           | 18,9 ± 3,7         | 72,7 ± 4,2       | 4,3 ± 0,3             | 48,9 ± 4,9        |
| <b>P</b>              | n.s.                             | n.s.                 | n.s.                                   | n.s.               | n.s.             | n.s.                  | n.s.              |

Anzahl der Versuchstiere in beiden Gruppen: n=9, n.s.: nicht signifikant

**Tabelle 6:** Darstellung der präoperativen diastolischen rechtsventrikulären Funktion am Messzeitpunkt 1

| Diastolische Funktion |                      |                    |  |
|-----------------------|----------------------|--------------------|--|
|                       | <b>EDP</b><br>[mmHg] | <b>EDV</b><br>[ml] | <b>dp/dt<sub>min</sub></b><br>[mmHg/s] |
| <b>Zellgruppe</b>     | 10,1 ± 1,0           | 57,1 ± 2,7         | -329,3 ± 31,0                          |
| <b>Kontrollgruppe</b> | 11,6 ± 1,1           | 67,8 ± 6,0         | -310,1 ± 15,5                          |
| <b>p</b>              | n.s.                 | n.s.               | n.s.                                   |

Anzahl der Versuchstiere in beiden Gruppen: n=9, n.s.: nicht signifikant

### 3.5.3. Frühe postoperative Messungen (Messzeitpunkt 2)

#### 3.5.3.1 Systolische Funktion

Nach der Inzision des RVOT und der Implantation der transanulären Erweiterungsplastik war im Vergleich zu den präoperativen Werten am Messzeitpunkt 1 ein Abfall der rechtsventrikulären EF um 28% in der Zellgruppe sowie um 20% in der Kontrollgruppe zu verzeichnen (beide  $p=0,008$ ). Im Vergleich zum Messzeitpunkt 1 erhöhte sich direkt postoperativ in beiden Gruppen der Spitzenwert des maximalen Druckanstiegs, definiert über  $dp/dt_{\max}$  (Zellgruppe: 16%, Kontrollgruppe: 15%, beide mit  $p=0,039$ ), der rechtsventrikuläre maximale Druck (Zellgruppe: 12%;  $p=0,023$ , Kontrollgruppe: 16%;  $p=0,008$ ) und das rechtsventrikuläre ESV (Zellgruppe: 2,7-fach, Kontrollgruppe: 2,3-fach, beide  $p=0,008$ ) signifikant (Abb. 17). Obwohl der Anstieg des Herzzeitvolumens (HZV) von 31% in der Kontrollgruppe eine Signifikanz erreicht ( $p=0,023$ ), zeigt die Erhöhung des HZV um 32% in den Herzen der Zellgruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p=0,078$ ) im Vergleich zu den präoperativen Werten. Zusätzlich kann im Vergleich zu den präoperativen Werten ein Anstieg des Schlagvolumens (Zellgruppe: 21%, Kontrollgruppe: 25%) verzeichnet werden, der jedoch in beiden Gruppen keine statistische Signifikanz aufweist. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die frühe systolische postoperative Funktion in beiden Gruppen ähnlich war.

**Tabelle 7:** Vergleich der systolischen rechtsventrikulären Funktion zwischen den Messzeitpunkten 1 und 2 innerhalb der Gruppen

|                      | Systolische Funktion |               |                            |              |              |                |            |
|----------------------|----------------------|---------------|----------------------------|--------------|--------------|----------------|------------|
|                      | $P_{\max}$<br>[mmHg] | ESP<br>[mmHg] | $dp/dt_{\max}$<br>[mmHg/s] | ESV<br>[ml]  | EF<br>[%]    | HZV<br>[l/min] | SV<br>[ml] |
| <b>Zellgr. 1</b>     | 26,8 ± 1,4           | 19,1 ± 1,1    | 439,2 ± 35,8               | 14,5 ± 2,5   | 75,4 ± 3,4   | 3,8 ± 0,1      | 42,7 ± 2,0 |
| <b>Zellgr. 2</b>     | 29,9 ± 1,0           | 20,5 ± 0,9    | 508,3 ± 26,1               | 38,9 ± 9,3   | 54,7 ± 4,2   | 5,0 ± 0,1      | 51,4 ± 9,6 |
| <b>P</b>             | <b>0,023</b>         | 0,383         | <b>0,039</b>               | <b>0,008</b> | <b>0,008</b> | 0,078          | 0,195      |
| <b>Kontrollgr. 1</b> | 26,9 ± 1,7           | 20,4 ± 1,2    | 415,1 ± 25,2               | 19,0 ± 3,7   | 72,8 ± 4,2   | 4,3 ± 0,4      | 48,9 ± 4,7 |
| <b>Kontrollgr. 2</b> | 31,0 ± 1,7           | 22,9 ± 1,2    | 476,9 ± 43,2               | 43,2 ± 7,4   | 58,5 ± 4,4   | 5,6 ± 0,7      | 60,8 ± 7,1 |
| <b>P</b>             | <b>0,008</b>         | <b>0,016</b>  | <b>0,039</b>               | <b>0,008</b> | <b>0,008</b> | <b>0,023</b>   | 0,055      |

Anzahl der Versuchstiere in beiden Gruppen: n=9

**Tabelle 8:** Veranschaulichung der frühen postoperativen systolischen rechtsventrikulären Funktion am Messzeitpunkt 2

|                       | <b>Systolische Funktion</b>      |                      |  |                    |                  |                       |                   |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------|--|--------------------|------------------|-----------------------|-------------------|
|                       | <b>P<sub>max</sub></b><br>[mmHg] | <b>ESP</b><br>[mmHg] | <b>dp/dt<sub>max</sub></b><br>[mmHg/s] | <b>ESV</b><br>[ml] | <b>EF</b><br>[%] | <b>HZV</b><br>[l/min] | <b>SV</b><br>[ml] |
| <b>Zellgruppe</b>     | 29,9 ± 1,0                       | 20,5 ± 0,9           | 508,3 ± 26,1                           | 38,9 ± 9,3         | 54,6 ± 4,2       | 4,9 ± 0,1             | 51,4 ± 9,6        |
| <b>Kontrollgruppe</b> | 31,0 ± 1,6                       | 22,9 ± 1,2           | 476,9 ± 43,2                           | 43,2 ± 7,4         | 58,5 ± 4,4       | 5,6 ± 0,6             | 60,8 ± 7,1        |
| <b>P</b>              | n.s.                             | n.s.                 | n.s.                                   | n.s.               | n.s.             | n.s.                  | n.s.              |

Anzahl der Versuchstiere in beiden Gruppen: n=9, n.s.: nicht signifikant

### 3.5.3.2 Diastolische Funktion

Das rechtsventrikuläre EDV ist einer der Hauptindikatoren für die ventrikuläre Volumenbelastung (Abb. 17). Dieser Parameter war im Vergleich zu den präoperativen Werten am Messzeitpunkt 1 in beiden Gruppen postoperativ signifikant erhöht (Zellgruppe: 58%; p=0,023 und Kontrollgruppe: 54%; p=0,008). Ferner war der EDP nach dem operativen Eingriff bei den Kontrolltieren mit 36% signifikant erhöht (p=0,016), während ein Anstieg von 20% in der Zellgruppe keine Signifikanz aufwies (p=0,055). Der Spitzenwert des maximalen Druckabfalls, festgelegt durch dp/dt<sub>min</sub>, ergab in beiden Gruppen gegenüber den präoperativen Werten keinen signifikanten Unterschied (Zellgruppe: p=0,641; Kontrollgruppe: p=0,148). Der Vergleich der postoperativen Parameter zwischen den beiden Gruppen zeigt keine signifikanten Unterschiede in der diastolischen Funktion des Herzens.

**Tabelle 10:** Vergleich der diastolischen rechtsventrikulären Funktion zwischen den Messzeitpunkten 1 und 2 innerhalb der Gruppen

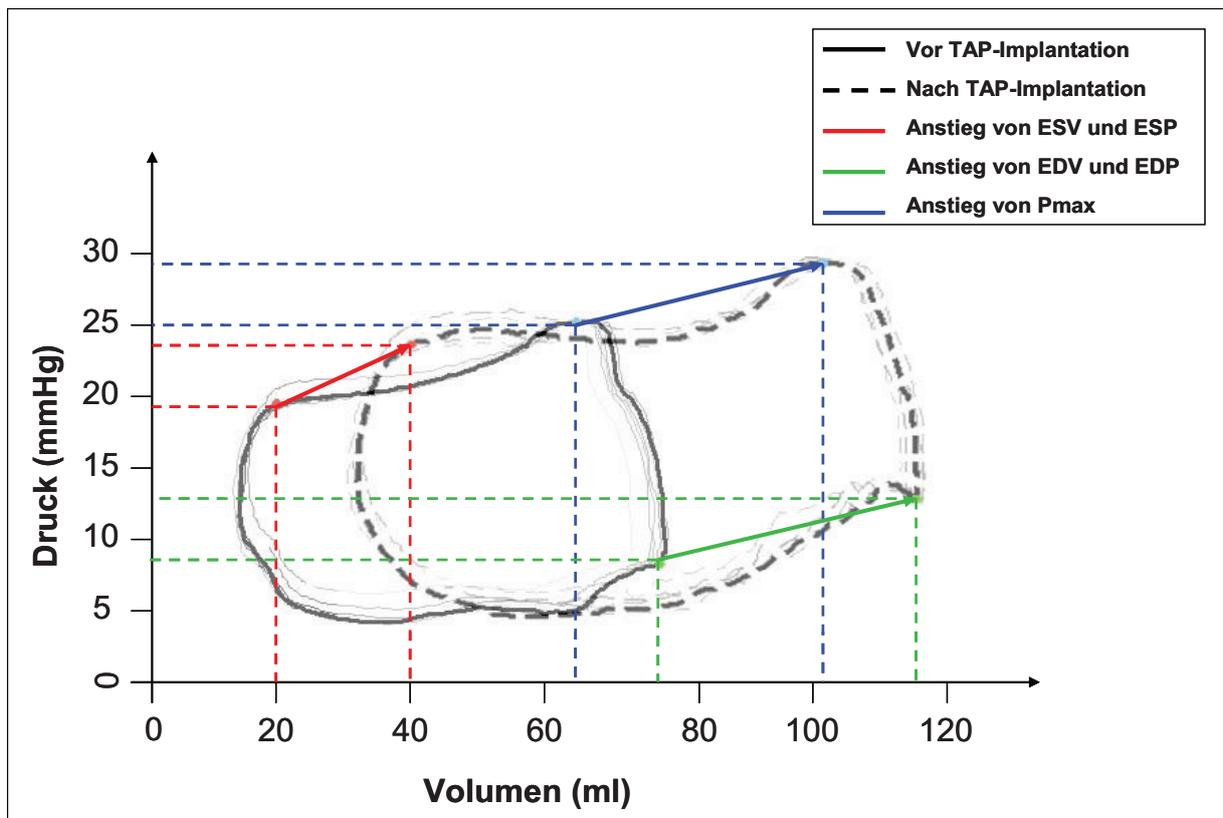
|                         | <b>Diastolische Funktion</b> |                    |  |
|-------------------------|------------------------------|--------------------|--|
|                         | <b>EDP</b><br>[mmHg]         | <b>EDV</b><br>[ml] | <b>dp/dt<sub>min</sub></b><br>[mmHg/s] |
| <b>Zellgruppe 1</b>     | 10,1 ± 1,0                   | 57,1 ± 2,7         | -329,3 ± 31,0                          |
| <b>Zellgruppe 2</b>     | 12,1 ± 0,9                   | 90,2 ± 17,6        | -324,42 ± 18,3                         |
| <b>p</b>                | 0,055                        | <b>0,023</b>       | 0,641                                  |
| <b>Kontrollgruppe 1</b> | 11,6 ± 1,1                   | 67,8 ± 6,00        | -310,1 ± 15,5                          |
| <b>Kontrollgruppe 2</b> | 15,7 ± 1,3                   | 103,9 ± 10,8       | -331,4 ± 25,3                          |
| <b>p</b>                | <b>0,016</b>                 | <b>0,008</b>       | 0,148                                  |

Anzahl der Versuchstiere in beiden Gruppen: n=9

**Tabelle 8:** Veranschaulichung der frühen postoperativen diastolischen rechtsventrikulären Funktion am Messzeitpunkt 2

|                       | Diastolische Funktion |              |                                  |
|-----------------------|-----------------------|--------------|----------------------------------|
|                       | EDP<br>[mmHg]         | EDV<br>[ml]  | dp/dt <sub>min</sub><br>[mmHg/s] |
| <b>Zellgruppe</b>     | 12,1 ± 0,9            | 90,2 ± 17,6  | -324,4 ± 18,8                    |
| <b>Kontrollgruppe</b> | 15,7 ± 1,3            | 103,9 ± 10,8 | -331,4 ± 25,3                    |
| <b>p</b>              | n.s.                  | n.s.         | n.s.                             |

Anzahl der Versuchstiere in beiden Gruppen: n=9, n.s.: nicht signifikant



**Abb. 17:** Postoperativer Anstieg der Volumenwerte ESV und EDV sowie der Parameter ESP, EDP und  $P_{\max}$  im Vergleich zur präoperativen Herzfunktion. EDP: enddiastolischer Druck, EDV: enddiastolisches Volumen, ESP: endsystolischer Druck, ESV: endsystolisches Volumen,  $P_{\max}$ : maximaler Spitzendruck

### 3.5.4. Postoperative Messungen der rechtsventrikulären Herzfunktion nach 3 Monaten

#### 3.5.4.1 Systolische Funktion unter Ruhebedingungen (Messzeitpunkt 3)

Unter Ruhebedingungen wurden im Vergleich zu den präoperativen Werten am Messzeitpunkt 1 signifikant niedrigere Werte für das HZV (Zellgruppe: 19%;  $p=0,016$ , Kontrollgruppe: 30%;  $p=0,008$ ) und das SV (Zellgruppe: 28%;  $p=0,031$ , Kontrollgruppe: 42%,  $p=0,008$ ) in beiden Gruppen ermittelt.

Die Parameter EF,  $dp/dt_{\max}$ ,  $P_{\max}$  und ESV waren im Vergleich zu den präoperativen Befunden weder in der Zellgruppe ( $p=0,156$ ,  $p=0,078$ ,  $p=0,297$ ) noch in der Kontrollgruppe ( $p=0,641$ ,  $p=0,945$ ,  $p=0,641$ ) signifikant different.

**Tabelle 11:** Vergleich der systolischen rechtsventrikulären Funktion zwischen den Messzeitpunkten 1 und 3 innerhalb der Gruppen

|                      | Systolische Funktion |               |                            |             |            |                |              |
|----------------------|----------------------|---------------|----------------------------|-------------|------------|----------------|--------------|
|                      | $P_{\max}$<br>[mmHg] | ESP<br>[mmHg] | $dp/dt_{\max}$<br>[mmHg/s] | ESV<br>[ml] | EF<br>[%]  | HZV<br>[l/min] | SV<br>[ml]   |
| <b>Zellgr. 1</b>     | 27,2 ± 1,8           | 19,3 ± 1,4    | 442,0 ± 46,7               | 14,1 ± 3,1  | 76,6 ± 4,0 | 3,8 ± 0,2      | 44,1 ± 2,2   |
| <b>Zellgr. 3</b>     | 26,9 ± 2,3           | 19,3 ± 2,1    | 326,8 ± 47,1               | 18,2 ± 3,8  | 66,9 ± 5,1 | 3,1 ± 0,3      | 31,7 ± 3,1   |
| <b>P</b>             | 0,938                | 0,938         | 0,078                      | 0,297       | 0,156      | <b>0,016</b>   | <b>0,031</b> |
| <b>Kontrollgr. 1</b> | 27,1 ± 1,9           | 20,5 ± 1,4    | 411,5 ± 28,3               | 18,5 ± 4,1  | 72,8 ± 4,8 | 4,2 ± 0,4      | 47,8 ± 5,4   |
| <b>Kontrollgr. 3</b> | 30,4 ± 2,2           | 20,8 ± 1,9    | 432,3 ± 75,0               | 19,9 ± 4,9  | 61,6 ± 4,7 | 2,9 ± 0,4      | 28,0 ± 2,7   |
| <b>P</b>             | 0,383                | 0,945         | 0,945                      | 0,641       | 0,641      | <b>0,008</b>   | <b>0,008</b> |

Anzahl der Versuchstiere am Messzeitpunkt 1 in beiden Gruppen: n=9, Anzahl der Versuchstiere am Messzeitpunkt 3 in der Zellgruppe: n=7 und in der Kontrollgruppe: n=8

In der Kontrollgruppe erschienen die Veränderungen für das SV und das HZV zwischen Messzeitpunkt 1 und Messzeitpunkt 3 gravierender als in der Zellgruppe. Im Gruppenvergleich konnte jedoch hinsichtlich der systolischen rechtsventrikulären Herzfunktion am Messzeitpunkt 3 kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Zellgruppe festgestellt werden.

**Tabelle 12:** Vergleich der systolischen rechtsventrikulären Funktion zwischen den Gruppen am Messzeitpunkt 3

|                       | Systolische Funktion |               |                            |             |            |                 |            |
|-----------------------|----------------------|---------------|----------------------------|-------------|------------|-----------------|------------|
|                       | $P_{\max}$<br>[mmHg] | ESP<br>[mmHg] | $dp/dt_{\max}$<br>[mmHg/s] | ESV<br>[ml] | EF<br>[%]  | HZV<br>[ml/min] | SV<br>[ml] |
| <b>Zellgruppe</b>     | 26,9 ± 2,3           | 19,3 ± 2,1    | 326,8 ± 47,1               | 18,2 ± 3,8  | 66,9 ± 5,1 | 3,1 ± 0,3       | 31,7 ± 3,1 |
| <b>Kontrollgruppe</b> | 30,4 ± 2,2           | 20,8 ± 1,9    | 432,3 ± 75,0               | 19,9 ± 4,8  | 61,6 ± 4,7 | 2,9 ± 0,4       | 28,0 ± 2,7 |
| <b>P</b>              | 0,278                | 0,604         | 0,271                      | 0,794       | 0,459      | 0,709           | 0,378      |

Anzahl der Versuchstiere in der Zellgruppe: n=7 und in der Kontrollgruppe: n=8

## 3.5.4.2 Systolische Funktion in der Dobutamin-Stress-Messung (Messzeitpunkt 4)

Unter medikamentös induziertem Stress zeigte sich in der Zellgruppe eine signifikante Erhöhung der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dp/dt_{max}$  um 20% im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p=0,033$ ). In der Dobutamin-Stress-Messung konnte im Gruppenvergleich für die systolische rechtsventrikuläre Herzfunktion kein weiterer signifikanter Unterschied festgestellt werden.

**Tabelle 13:** Vergleich der systolischen rechtsventrikulären Funktion zwischen den Gruppen am Messzeitpunkt 4

|                       | Systolische Funktion |               |                           |             |            |                |            |
|-----------------------|----------------------|---------------|---------------------------|-------------|------------|----------------|------------|
|                       | $P_{max}$<br>[mmHg]  | ESP<br>[mmHg] | $dp/dt_{max}$<br>[mmHg/s] | ESV<br>[ml] | EF<br>[%]  | HZV<br>[l/min] | SV<br>[ml] |
| <b>Zellgruppe</b>     | 54,1 ± 5,0           | 42,4 ± 5,4    | 1882,0 ± 135,1            | 7,8 ± 1,3   | 74,8 ± 4,4 | 5,1 ± 0,4      | 23,3 ± 1,8 |
| <b>Kontrollgruppe</b> | 46,5 ± 3,7           | 35,3 ± 4,0    | 1512,8 ± 84,8             | 9,5 ± 2,8   | 69,5 ± 4,8 | 3,8 ± 0,3      | 18,5 ± 1,7 |
| <b>P</b>              | 0,235                | 0,293         | <b>0,033</b>              | 0,632       | 0,441      | 0,094          | 0,075      |

Anzahl der Versuchstiere in der Zellgruppe: n=7 und in der Kontrollgruppe: n=8

## 3.5.4.3 Diastolische Funktion unter Ruhebedingungen (Messzeitpunkt 3)

Unter Ruhebedingungen konnte im Vergleich zum Messzeitpunkt 1 für die beiden Parameter EDV und EDP kein signifikanter Unterschied in beiden Gruppen aufgezeigt werden. Zwischen Messzeitpunkt 1 und Messzeitpunkt 3 konnte in beiden Gruppen ein mäßiger Abfall des  $dp/dt_{min}$ -Wertes beobachtet werden. Die Veränderungen waren jedoch statistisch nicht signifikant (Zellgruppe: 24%;  $p=0,078$ , Kontrollgruppe: 22%;  $p=0,055$ ).

**Tabelle 14:** Vergleich der diastolischen rechtsventrikulären Funktion zwischen den Messzeitpunkten 1 und 3 innerhalb der Gruppen

|                         | Diastolische Funktion |             |                           |
|-------------------------|-----------------------|-------------|---------------------------|
|                         | EDP<br>[mmHg]         | EDV<br>[ml] | $dp/dt_{min}$<br>[mmHg/s] |
| <b>Zellgruppe 1</b>     | 10,7 ± 1,4            | 58,2 ± 3,4  | -334,1 ± 40,3             |
| <b>Zellgruppe 3</b>     | 11,7 ± 2,3            | 49,9 ± 6,7  | -254,4 ± 25,3             |
| <b>p</b>                | 1,000                 | 0,109       | 0,078                     |
| <b>Kontrollgruppe 1</b> | 11,9 ± 1,1            | 66,1 ± 6,6  | -314,2 ± 17,0             |
| <b>Kontrollgruppe 3</b> | 9,4 ± 0,5             | 47,8 ± 7,1  | -246,1 ± 28,6             |
| <b>p</b>                | 0,148                 | 0,055       | 0,055                     |

Anzahl der Versuchstiere am Messzeitpunkt 1 in beiden Gruppen: n=9, Anzahl der Versuchstiere am Messzeitpunkt 3 in der Zellgruppe: n=7 und in der Kontrollgruppe: n=8

In der Ruhemessung nach 3 Monaten konnte für die diastolische rechtsventrikuläre Herzfunktion kein Unterschied zwischen den Gruppen verzeichnet werden.

**Tabelle 15:** Vergleich der diastolischen rechtsventrikulären Funktion zwischen den Gruppen am Messzeitpunkt 3

|                       | Diastolische Funktion |             |                                  |
|-----------------------|-----------------------|-------------|----------------------------------|
|                       | EDP<br>[mmHg]         | EDV<br>[ml] | dp/dt <sub>min</sub><br>[mmHg/s] |
| <b>Zellgruppe</b>     | 11,7 ± 2,3            | 49,9 ± 6,7  | -254,4 ± 25,3                    |
| <b>Kontrollgruppe</b> | 9,4 ± 0,5             | 47,8 ± 7,1  | -246,1 ± 28,6                    |
| <b>p</b>              | 0,852                 | 0,837       | 0,834                            |

Anzahl der Versuchstiere in der Zellgruppe: n=7 und in der Kontrollgruppe: n=8

#### 3.5.4.4 Diastolische Funktion in der Dobutamin-Stress-Messung (Messzeitpunkt 4)

In der Dobutamin-Stress-Messung zeigt sich in der Zellgruppe eine höhere maximale Geschwindigkeit des Druckabfalls dp/dt<sub>min</sub> gegenüber der Kontrollgruppe (dp/dt<sub>min</sub> 27%, p=0,043).

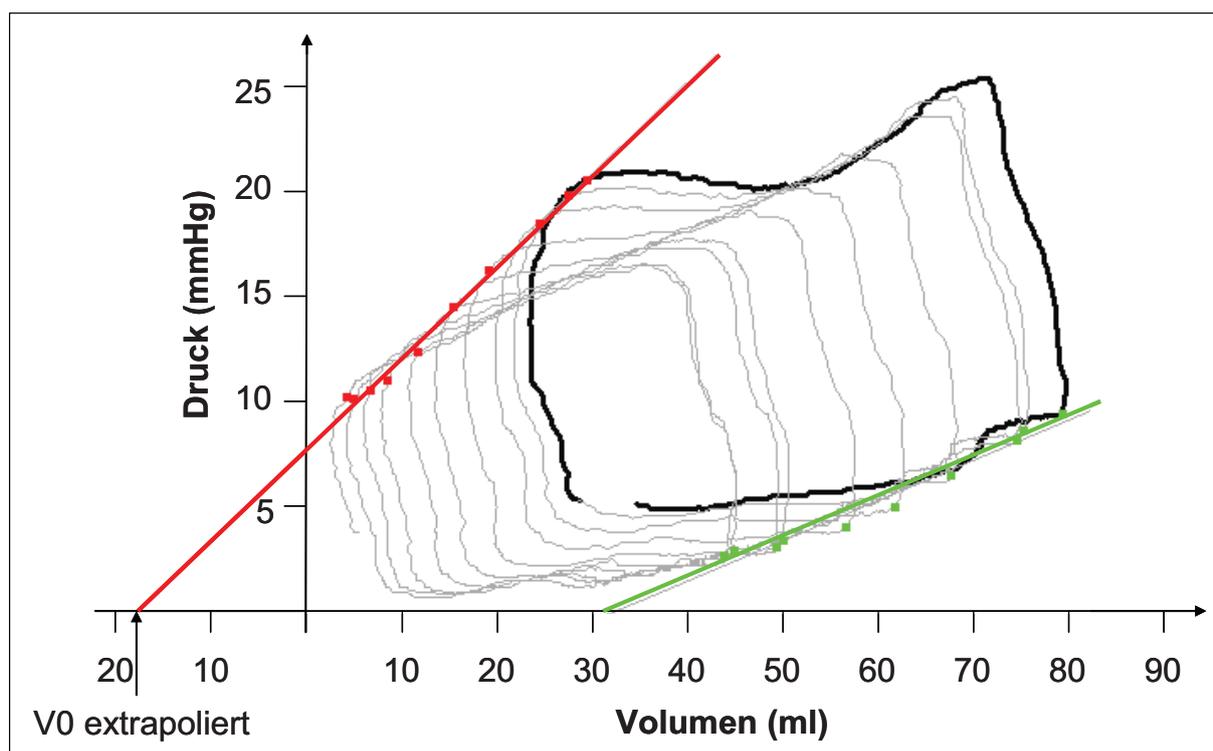
**Tabelle 16:** Vergleich der diastolischen rechtsventrikulären Funktion zwischen den Gruppen am Messzeitpunkt 4

|                       | Diastolische Funktion |             |                                  |
|-----------------------|-----------------------|-------------|----------------------------------|
|                       | EDP<br>[mmHg]         | EDV<br>[ml] | dp/dt <sub>min</sub><br>[mmHg/s] |
| <b>Zellgruppe</b>     | 9,5 ± 1,5             | 31,1 ± 1,7  | -902,9 ± 101,6                   |
| <b>Kontrollgruppe</b> | 12,1 ± 1,7            | 27,9 ± 3,9  | -665,5 ± 44,9                    |
| <b>p</b>              | 0,279                 | 0,491       | <b>0,043</b>                     |

Anzahl der Versuchstiere in der Zellgruppe: n=7 und in der Kontrollgruppe: n=8

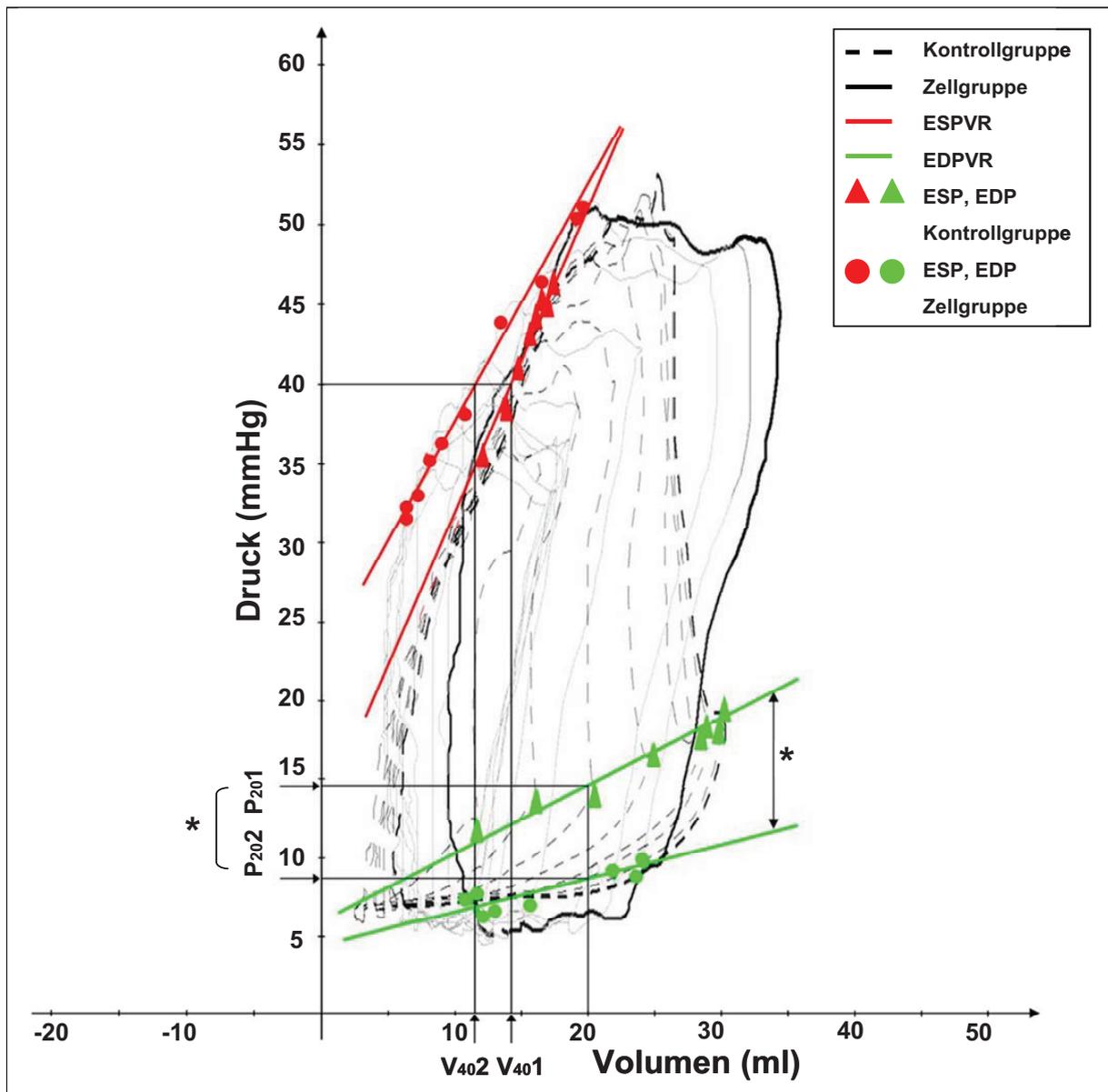
#### 3.5.4.5 Vorlastreduktionsmanöver (Messzeitpunkt 3 und 4)

Die Werte für die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR) und die für die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR) wurden in Vorlastreduktionsmanövern mit einem Ballonkatheter in der V. cava inferior ermittelt. Die Parameter ESPVR und EDPVR sind Indices für die Kontraktilität und Elastizität des rechten Herzens (Abb. 18). Die Anstiege Ees und Eed, der Druck-Volumen-Beziehungen ESPVR und EDPVR sowie die Werte des Parameters PRSW geben ebenfalls Auskunft über die Kontraktilität und die Elastizität des Herzens.



**Abb. 18:** Graphische Darstellung der postoperativen Vorlastreduktionsmessung zur Ermittlung der enddiastolischen (EDPVR) sowie der endsystolischen (ESPVR) Druck-Volumen-Beziehung in der Stammzellgruppe nach 3 Monaten.

Die Gerade durch die Punkte der endsystolischen Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR) birgt eine Fehlerquelle (82). Der  $V_0$ -Wert der ESPVR ist negativ extrapoliert (Abb. 18).  $V_0$  definiert das Volumen bei einem ESP-Wert von 0 mmHg und sollte nicht negativ sein. Die Verschiebung der Funktionen entlang der Druck- und Volumenachse und die damit einhergehenden Änderungen der Werte für  $E_{es}$  und  $E_{ed}$  bleiben dennoch geeignet, Vergleiche bezüglich der Kontraktilität und der Elastizität zu ziehen. Die entsprechende Quantifizierung des Volumenabschnittes der ESPVR innerhalb des Druckbereiches zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen unter Ruhebedingungen ( $V_{20}$ ) und unter Dobutamin-Stress ( $V_{40}$ ). Unter Dobutamin-Stress-Bedingungen verlagerte sich in der Zellgruppe die Gerade der EDPVR nach rechts unten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 19). In der Zellgruppe waren die Druckwerte der EDPVR ( $P_{20}$ ) um 39% ( $p=0,044$ ) und deren Anstieg, dem  $E_{ed}$ -Wert, um 57% ( $p=0,009$ ) signifikant reduziert (Abb. 19). Der  $E_{es}$ -Wert variierte zwischen den Gruppen nicht.



**Abb. 19:** Graphische Darstellung von ESPVR und EDPVR im Gruppenvergleich. Die Abbildung verdeutlicht die signifikant (\*) niedrigeren Werte für P20 und den Anstieg Eed der EDPVR in der Zellgruppe gegenüber den Werten in der Kontrollgruppe. EDP: enddiastolischer Druck, EDPVR: enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung, EDV: enddiastolisches Volumen, ESP: endsystolischer Druck, ESPVR: endsystolische Druck-Volumen-Beziehung, ESV: endsystolisches Volumen, P20: Volumen bei definiertem Druck von 20 mmHg

**Tabelle 17:** Werte der Vorlastreduktionsmanöver im Gruppenvergleich am Messzeitpunkt 3

|                       | Vorlastreduktionsmanöver |                  |                           |                           |                  |                         |                         |
|-----------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|
|                       | PRSW<br>[ml x mmHg]      | Eed<br>[mmHg/ml] | P <sub>40</sub><br>[mmHg] | P <sub>20</sub><br>[mmHg] | Ees<br>[mmHg/ml] | V <sub>20</sub><br>[ml] | V <sub>40</sub><br>[ml] |
| <b>Zellgruppe</b>     | 12,4 ± 1,5               | 0,2 ± 0,1        | 5,7 ± 1,0                 | n.a.                      | 0,9 ± 0,2        | 30,9 ± 4,2              | n.a.                    |
| <b>Kontrollgruppe</b> | 16,4 ± 2,6               | 0,2 ± 0,1        | 5,1 ± 2,2                 | n.a.                      | 1,2 ± 0,2        | 27,1 ± 5,5              | n.a.                    |
| <b>p</b>              | 0,224                    | 0,731            | 0,809                     |                           | 0,228            | 0,600                   |                         |

Anzahl der Versuchstiere in der Zellgruppe: n=7 und in der Kontrollgruppe: n=8, n.a.: nicht ausgewertet

**Tabelle 18:** Werte Vorlastreduktionsmanöver im Gruppenvergleich am Messzeitpunkt 4

|                       | Vorlastreduktionsmanöver |                  |                           |                           |                  |                         |                         |
|-----------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|
|                       | PRSW<br>[ml x mmHg]      | Eed<br>[mmHg/ml] | P <sub>40</sub><br>[mmHg] | P <sub>20</sub><br>[mmHg] | Ees<br>[mmHg/ml] | V <sub>20</sub><br>[ml] | V <sub>40</sub><br>[ml] |
| <b>Zellgruppe</b>     | 26,2 ± 2,7               | 0,3 ± 0,1        | n.a.                      | 7,5 ± 1,3                 | 2,5 ± 0,4        | n.a.                    | 13,7 ± 3,9              |
| <b>Kontrollgruppe</b> | 23,8 ± 2,8               | 0,7 ± 0,1        | n.a.                      | 12,4 ± 1,7                | 2,8 ± 0,7        | n.a.                    | 14,6 ± 3,1              |
| <b>p</b>              | 0,553                    | <b>0,009</b>     |                           | <b>0,044</b>              | 0,699            |                         | 0,829                   |

Anzahl der Versuchstiere in der Zellgruppe: n=7 und in der Kontrollgruppe: n=8, n.a.: nicht ausgewertet

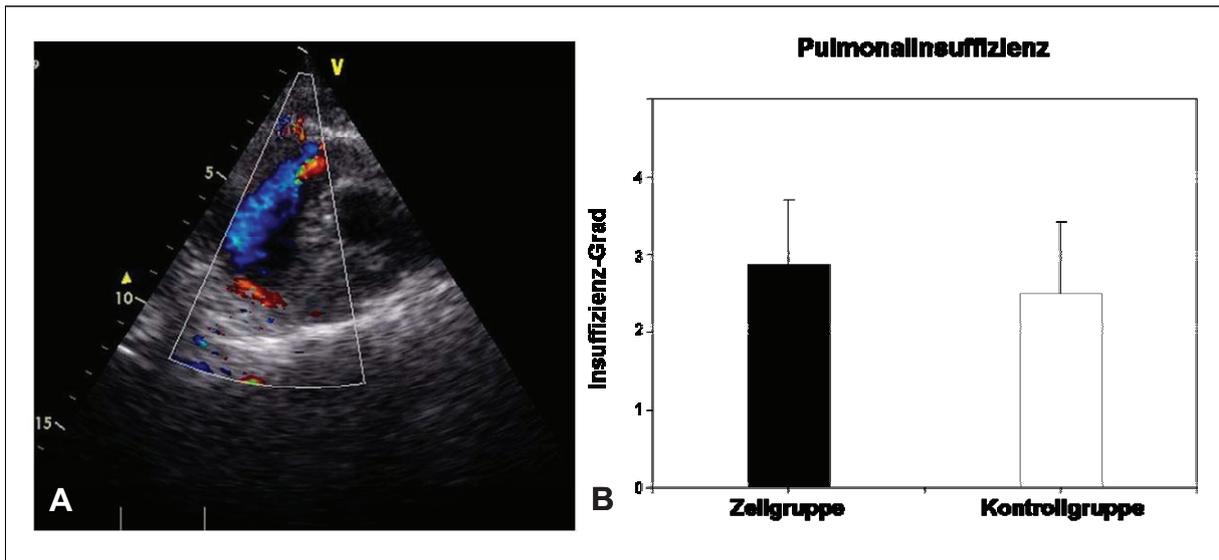
### 3.6 Transthorakale Echokardiographie

Die transthorakale Echokardiographie erfolgte in der 6. postoperativen Woche. Bei allen operierten Tieren konnte eine Pulmonalklappeninsuffizienz befundet werden. Die Auswertung der Insuffizienzgrade bestätigte, dass in beiden Gruppen ein ähnliches Ausmaß des Klappenschadens erzielt wurde (Abb. 20). Der Grad der Pulmonalklappeninsuffizienz betrug in der Kontrollgruppe  $2,5 \pm 0,3$  und in der Zellgruppe  $2,9 \pm 0,3$  ( $p=0,19$ ). Mit Hilfe der Echokardiographie konnten Aussagen über die rechts- und linksventrikuläre Funktion getroffen werden. Es wurden die Parameter RVEDV, das RVESV und die RVEF sowie die LVEF beurteilt. Keiner der Parameter wies signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Rechts- und linksventrikuläre Funktion in der transthorakalen Echokardiographie 6 Wochen postoperativ

|                       | RVEDV<br>[ml] | RVESV<br>[ml] | RVEF<br>[%] | LVEF<br>[%] |
|-----------------------|---------------|---------------|-------------|-------------|
| <b>Zellgruppe</b>     | 26,6 ± 7,0    | 7,2 ± 8,0     | 73,9 ± 3,0  | 72,7 ± 3,2  |
| <b>Kontrollgruppe</b> | 26,1 ± 9,4    | 9,0 ± 2,6     | 62,6 ± 12,0 | 60,3 ± 17,7 |
| <b>p</b>              | n.s.          | n.s.          | n.s.        | n.s.        |

Anzahl der Versuchstiere in beiden Gruppen: n=8, n.s.: nicht signifikant



**Abb. 20:** Der Grad der Pulmonalklappeninsuffizienz ist in beiden Gruppen ähnlich. Die Echokardiographie macht den Rückfluss über die Pulmonalklappe sichtbar.

### 3.7 Kardiale Computertomographie

Die Auswertung der kardialen Computertomographie (CT) ergab keinen Hinweis auf Verkalkungen und Tumorformationen im Myokard. Der Betrachtung der rechtsventrikulären Volumenverhältnisse konnte mit der CT-Diagnostik nicht nachgegangen werden, da für die quantitative Analyse Phasen der Apnoe notwendig gewesen wären.

### 3.8 Auswertung der Laborparameter

Zu den vier Abnahmezeitpunkten präoperativ, am ersten postoperativen Tag, am siebten postoperativen Tag und am Tag der zweiten Operation, konnte zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied festgestellt werden. In jeder Gruppe konnte der Verlauf des Experimentes anhand der Laborwerte zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkte verfolgt werden. In der postoperativen Phase zeigten sich signifikante Veränderungen im Vergleich zu den präoperativen Werten die im Langzeitverlauf wieder das Ausgangsniveau erreichten. Diese Parameter sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt. Die Parameter, die im Verlauf keine Schwankungen zeigten, z.B. Kreatinin, Harnstoff, ALAT, ASAT und AP wurden hier zu Gunsten der Übersichtlichkeit weggelassen. Die Konzentrationen von Troponin T und Myoglobin im Schafblut konnten mit den Messmethoden für humanes Material nicht bestimmt werden.

**Tabelle 20:** Normwerte des Schafes

| Blutbild         | Hb       | Hk       | Leu      | Thro     | Quick | Na       | K        | CK     | LDH   | Lac      |
|------------------|----------|----------|----------|----------|-------|----------|----------|--------|-------|----------|
|                  | [mmol/l] |          | [10E9/l] | [10E9/l] | [%]   | [mmol/l] | [mmol/l] | [U/l]  | [U/l] | [mmol/l] |
| <b>Normwerte</b> | 5,6-9,3  | 0,27-0,4 | 5,0-11,0 | -        | -     | 139-152  | 3,9-5,4  | 13-230 | <300  | 0,99-1,3 |

Quelle: Medizinische Tierklinik; Vet.med. Fakultät Universität Leipzig

Tabelle 21: Laborwerte im Verlauf des Experimentes.

| Parameter | Zellgruppe   |           | Kontrollgruppe |           |           |
|-----------|--------------|-----------|----------------|-----------|-----------|
| Hb 1      | 5,5 ± 0,2    | } p=0,007 | 5,5 ± 0,1      | } p=0,008 |           |
| Hb 2      | 6,3 ± 0,1    |           | 5,9 ± 0,2      |           |           |
| Hb 3      | 6,5 ± 0,2    | } p=0,025 | 6,0 ± 0,1      |           |           |
| Hb 4      | 4,4 ± 0,4    |           | 5,38 ± 0,2     |           |           |
| Hk 1      | 0,28 ± 0,1   | } p=0,021 | 0,30 ± 0,01    |           |           |
| Hk 2      | 0,30 ± 0,01  |           | 0,31 ± 0,02    |           |           |
| Hk 3      | 0,33 ± 0,01  | } p=0,018 | 0,33 ± 0,01    | } p=0,035 |           |
| Hk 4      | 0,22 ± 0,01  |           | 0,27 ± 0,01    |           |           |
| Leu 1     | 5,4 ± 0,5    | } p=0,008 | 5,0 ± 0,5      | } p=0,008 |           |
| Leu 2     | 9,3 ± 0,5    |           | 9,02 ± 1,0     |           |           |
| Leu 3     | 10,0 ± 1,0   | } p=0,008 | 8,3 ± 0,1      | } p=0,017 |           |
| Leu 4     | 4,0 ± 0,4    |           | 5,1 ± 0,3      |           |           |
| Thro 1    | 263,8 ± 28,4 | } p=0,024 | 250,2 ± 14,3   |           |           |
| Thro 2    | 327,2 ± 27,7 |           | 261,8 ± 18,1   |           |           |
| Thro 3    | 377,1 ± 23,5 | } p=0,008 | 489,9 ± 44,4   |           | } p=0,012 |
| Thro 4    | 183,4 ± 26,3 |           | 213,5 ± 18,1   |           |           |
| Quick 1   | 60,0 ± 2,6   | } p=0,049 | 62,1 ± 2,3     | } p=0,018 |           |
| Quick 2   | 55,6 ± 2,3   |           | 54,2 ± 3,5     |           |           |
| Quick 3   | 75,4 ± 4,9   |           | 85,1 ± 6,0     | } p=0,027 |           |
| Quick 4   | 59,9 ± 4,6   |           | 70,0 ± 4,5     |           |           |

Die rote Klammer zeigt die signifikanten p-Werte innerhalb der Zellgruppe zwischen den direkt nachfolgenden Messzeitpunkten. Die blaue Klammer gibt diese Werte für die Kontrollgruppe an. 1: Blutentnahme präoperativ, 2: Blutentnahme am 1. postoperativen Tag, 3: Blutentnahme am 7. Tag postoperativ, 4: Blutentnahme am Tag der zweiten Operation, Anzahl der Versuchstiere in 1, 2 und 3 in beiden Gruppen: n=9, Anzahl der Versuchstiere in 4 in der Zellgruppe: n=7 und in der Kontrollgruppe: n=8, Hb: Hämoglobin, Hk: Hämatokrit, Leu: Leukozyten, Thro: Thrombozyten

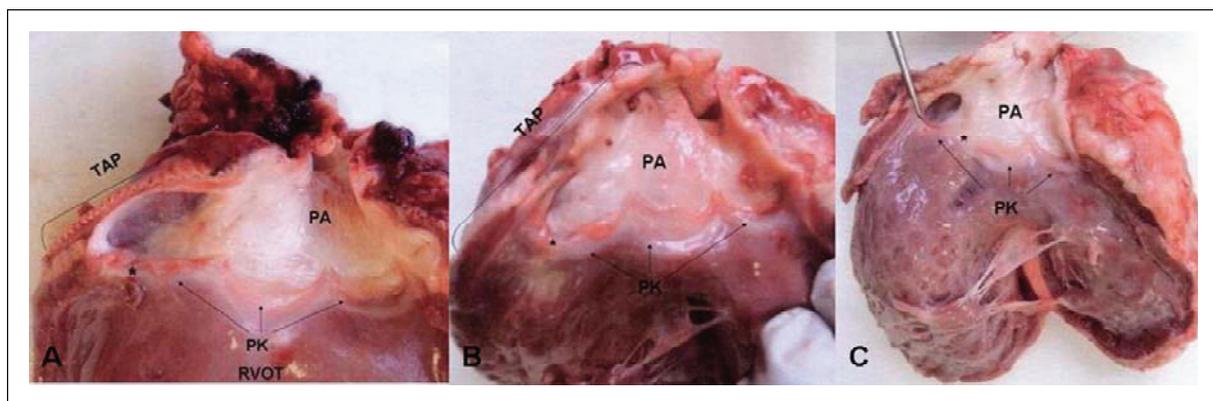
**Tabelle 22:** Laborwerte im Verlauf des Experimentes.

| Parameter | Zellgruppe      |           | Kontrollgruppe  |           |
|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| Na 1      | 142,0 ± 0,6     | } p=0,008 | 143,4 ± 0,6     | } p=0,008 |
| Na 2      | 147,4 ± 0,4     |           | 149,0 ± 0,5     |           |
| Na 3      | 145,2 ± 1,0     |           | 143,6 ± 0,7     |           |
| Na 4      | 142,1 ± 0,3     |           | 142,6 ± 0,9     |           |
| K 1       | 4,0 ± 0,1       |           | 3,8 ± 0,1       |           |
| K 2       | 3,5 ± 0,2       |           | 3,5 ± 0,2       | } p=0,033 |
| K 3       | 4,4 ± 0,1       |           | 4,4 ± 0,2       |           |
| K 4       | 4,3 ± 0,1       |           | 4,4 ± 0,2       |           |
| CK 1      | 1901,4 ± 595,8  | } p=0,043 | 735,0 ± 195,4   | } p=0,008 |
| CK 2      | 6718,7 ± 1560,0 |           | 5150,1 ± 1995,2 |           |
| CK 3      | 1493,0 ± 821,8  |           | 1496,6 ± 429,8  |           |
| CK 4      | 545,7 ± 71,6    |           | 515,5 ± 62,4    |           |
| LDH 1     | 532,9 ± 55,8    | } p=0,008 | 462,1 ± 17,2    | } p=0,008 |
| LDH 2     | 1693,4 ± 203,2  |           | 1584,6 ± 210,7  |           |
| LDH 3     | 877,2 ± 216,3   |           | 867,3 ± 118,3   |           |
| LDH 4     | 355,7 ± 21,6    |           | 366,6 ± 13,5    |           |
| Lac 1     | 3,0 ± 0,8       | } p=0,043 | 3,1 ± 0,8       | } p=0,008 |
| Lac 2     | 1,2 ± 0,1       |           | 1,2 ± 0,1       |           |
| Lac 3     | 3,6 ± 0,3       |           | 2,2 ± 0,3       |           |
| Lac 4     | 1,7 ± 0,3       |           | 2,3 ± 0,3       |           |

Die rote Klammer zeigt die signifikanten p-Werte innerhalb der Zellgruppe zwischen den direkt nachfolgenden Messzeitpunkten. Die blaue Klammer gibt diese Werte für die Kontrollgruppe an. 1: Blutentnahme präoperativ, 2: Blutentnahme am 1. postoperativen Tag, 3: Blutentnahme am 7. Tag postoperativ, 4: Blutentnahme am Tag der zweiten Operation, Anzahl der Versuchstiere in 1, 2 und 3 in beiden Gruppen: n=9, Anzahl der Versuchstiere in 4 in der Zellgruppe: n=7 und in der Kontrollgruppe: n=8, CK: Kreatinkinase, K: Kalium, Lac: Laktat, LDH: Laktatdehydrogenase, Na: Natrium

### 3.9 Makroskopische Beurteilung

Die makroskopische Beurteilung des rechten Ventrikels bestätigte, dass alle Herzen einen Defekt des Pulmonalklappenringes aufwiesen (Abb. 21 \*) wie es nach der Auswertung der Echokardiographie zu erwarten war. In dem Areal, wo der Defekt lokalisiert war, überzog fibrinöses reendothelialisiertes Gewebe die Erweiterungsplastik. In keinem der Herzen gab es Hinweise auf intravaskuläre Thromben oder Tumorformationen. Die typische Morphologie des rechten Ventrikels 3 Monate nach der Inzision des RVOT und der Implantation der Erweiterungsplastik ist in der Abbildung 21 zu sehen.

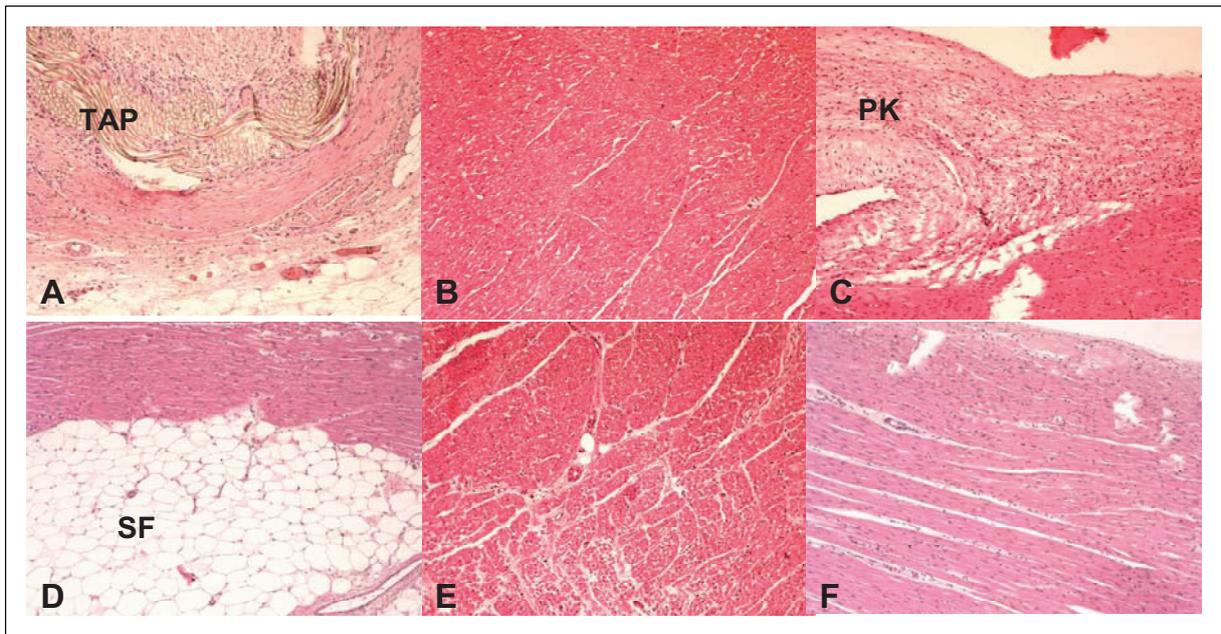


**Abb. 21:** Typische Gewebeformation und Morphologie des rechten Ventrikels 3 Monate nach der RVOT-Inzision und der Implantation der transanulären Erweiterungsplastik (TAP). (\*) markiert die erfolgreiche Valvulotomie der Pulmonalklappe in der Zellgruppe (A) und in der Kontrollgruppe (B). Sicht auf den aufgeklappten rechten Ventrikel in Abb. 21C. PA: Pulmonalarterie, PK: Pulmonalklappe, RVOT: rechtsventrikulärer Ausflusstrakt

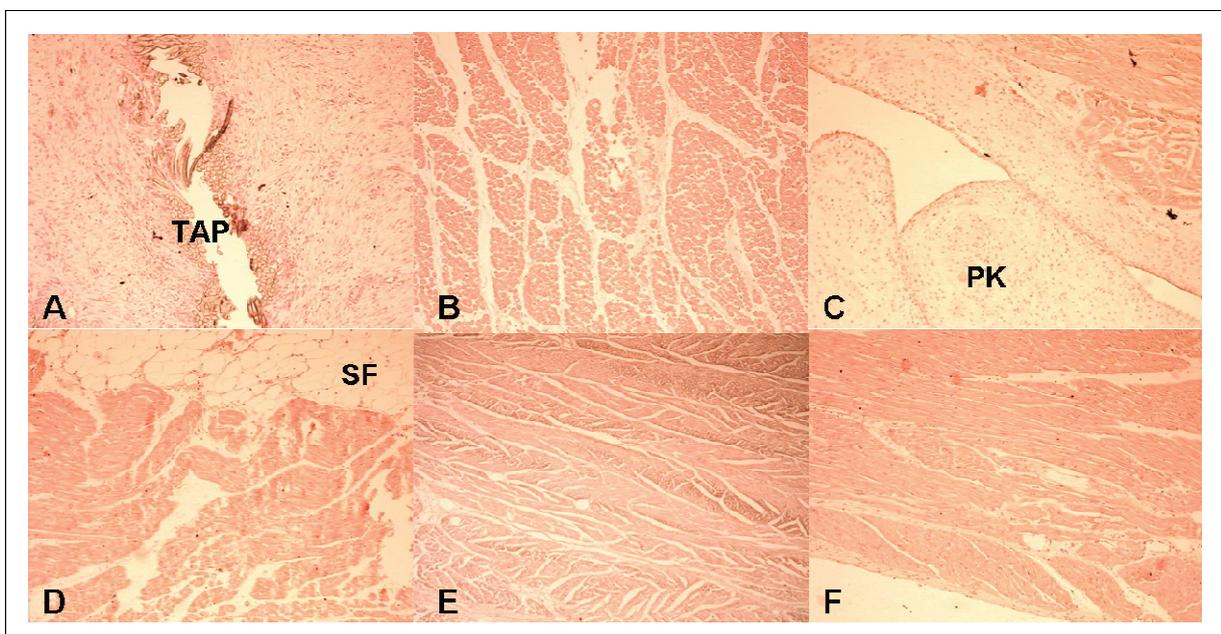
### 3.10 Histologie

#### 3.10.1 Histologische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der Gewebeproben 3 Monate postoperativ ergab in der H.E.-Färbung keinen Hinweis auf Tumorformation oder massive Entzündung (Abb. 22). Um die Erweiterungsplastik zeigten sich Entzündungszellinfiltrate im Sinne einer Fremdkörperreaktion. Verkalkungen in dem Areal direkt an der Erweiterungsplastik und in 1 cm Entfernung von der Erweiterungsplastik konnten in der Anfärbung nach Kossa ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb. 23).



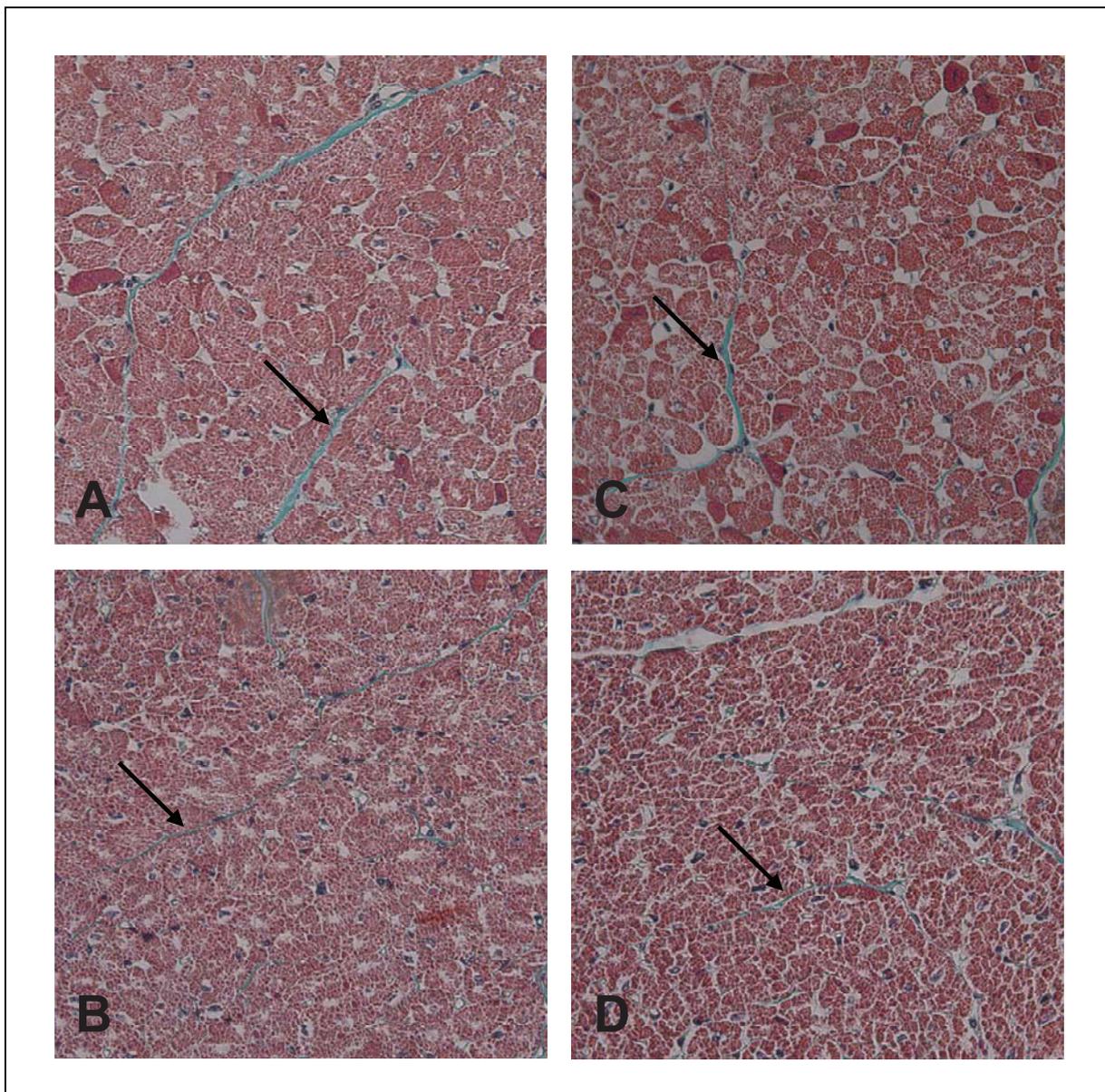
**Abb. 22:** H.E.-Färbung des Herzgewebes in der 100er Vergrößerung mit Anschnitt der TAP (A) und der Pulmonalklappe (C). Es gibt subepikardial (A und D), myokardial (B und E) sowie subendokardial (C und F) in der Region direkt an der Erweiterungsplastik (A, B, C) und in 1 cm Entfernung (D, E, F) keinen Hinweis auf Tumorformation oder massive Entzündung. PK: Pulmonalklappe, SF: subepikardiales Fett, TAP: transannuläre Erweiterungsplastik



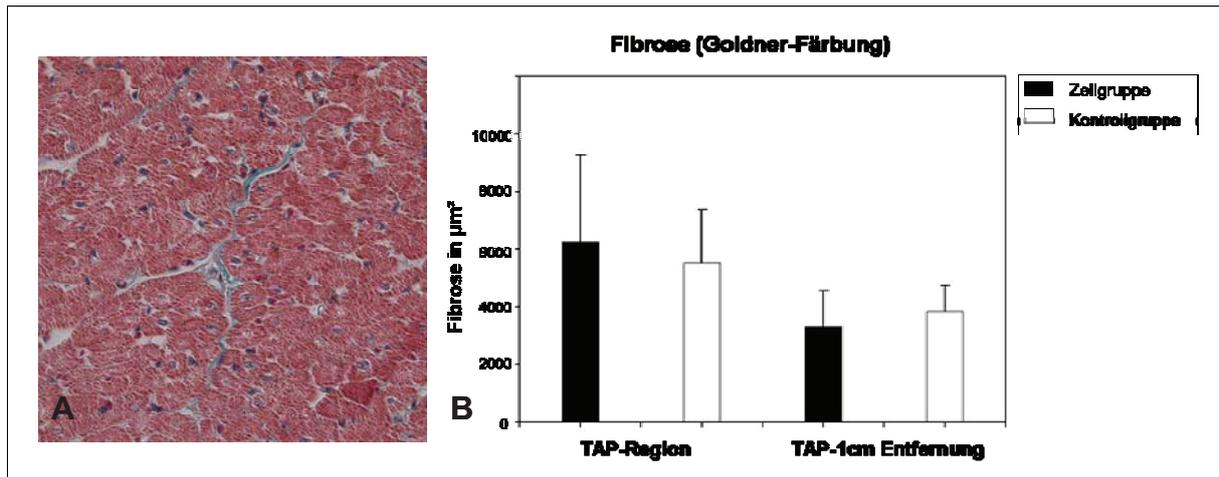
**Abb. 23:** Anfärbung des Herzgewebes nach Kossa in der 100er Vergrößerung mit Anschnitt der TAP (A) und der Pulmonalklappe (C). Es gibt subepikardial (A und D), myokardial (B und E) sowie subendokardial (C und F) in der Region direkt an der Erweiterungsplastik (A, B, C) und in 1 cm Entfernung (D, E, F) keinen Hinweis auf Kalzifikation. PK: Pulmonalklappe, SF: subepikardiales Fett, TAP: transannuläre Erweiterungsplastik

### 3.10.2 Interstitielle Fibrose

Nach der makroskopischen Präparation des Gewebes, wie oben beschrieben, wurde die Größe des fibrotischen Areals mit Hilfe der Planimetrie bestimmt. Die Auswertung des Ausmaßes der interstitiellen Fibrose (Abb. 25) ergab weder in der Region direkt um die Erweiterungsplastik (Zellgruppe:  $6257,0 \pm 1144,0 \mu\text{m}^2$ , Kontrollgruppe:  $5523,1 \pm 653,4 \mu\text{m}^2$ ,  $p=0,575$ ); noch in 1 cm Entfernung von der Erweiterungsplastik (Zellgruppe:  $3306,9 \pm 472,9 \mu\text{m}^2$ , Kontrollgruppe:  $3826,2 \pm 323,9 \mu\text{m}^2$ ,  $p=0,371$ ) einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden experimentellen Gruppen.



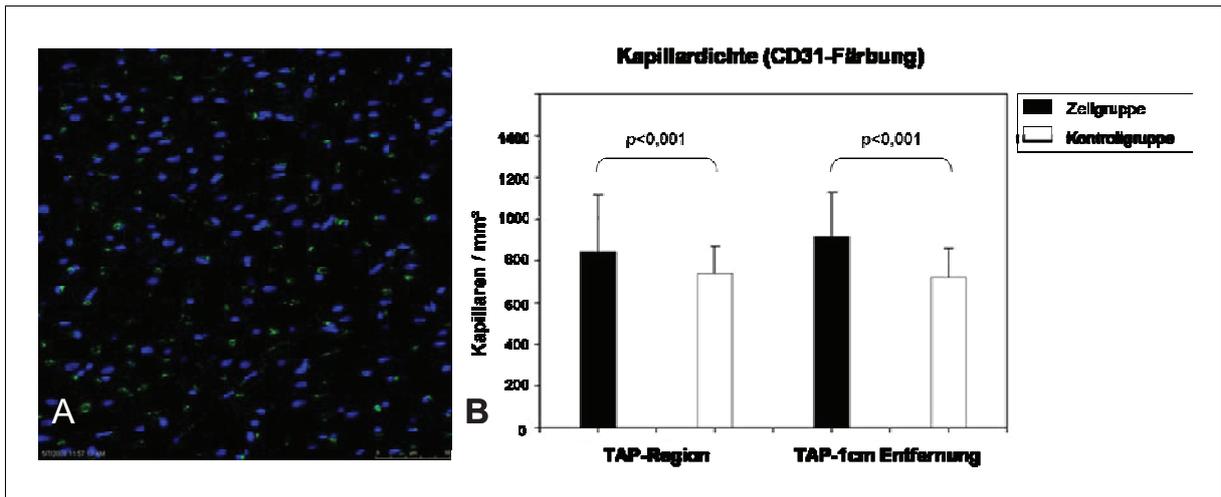
**Abb. 24:** Goldner-Färbung des Herzgewebes in der 400er Vergrößerung. Der Pfeil kennzeichnet die interstitielle Fibrose (grün) in der Zellgruppe (Bild A und B) und in der Kontrollgruppe (Bild C und D).



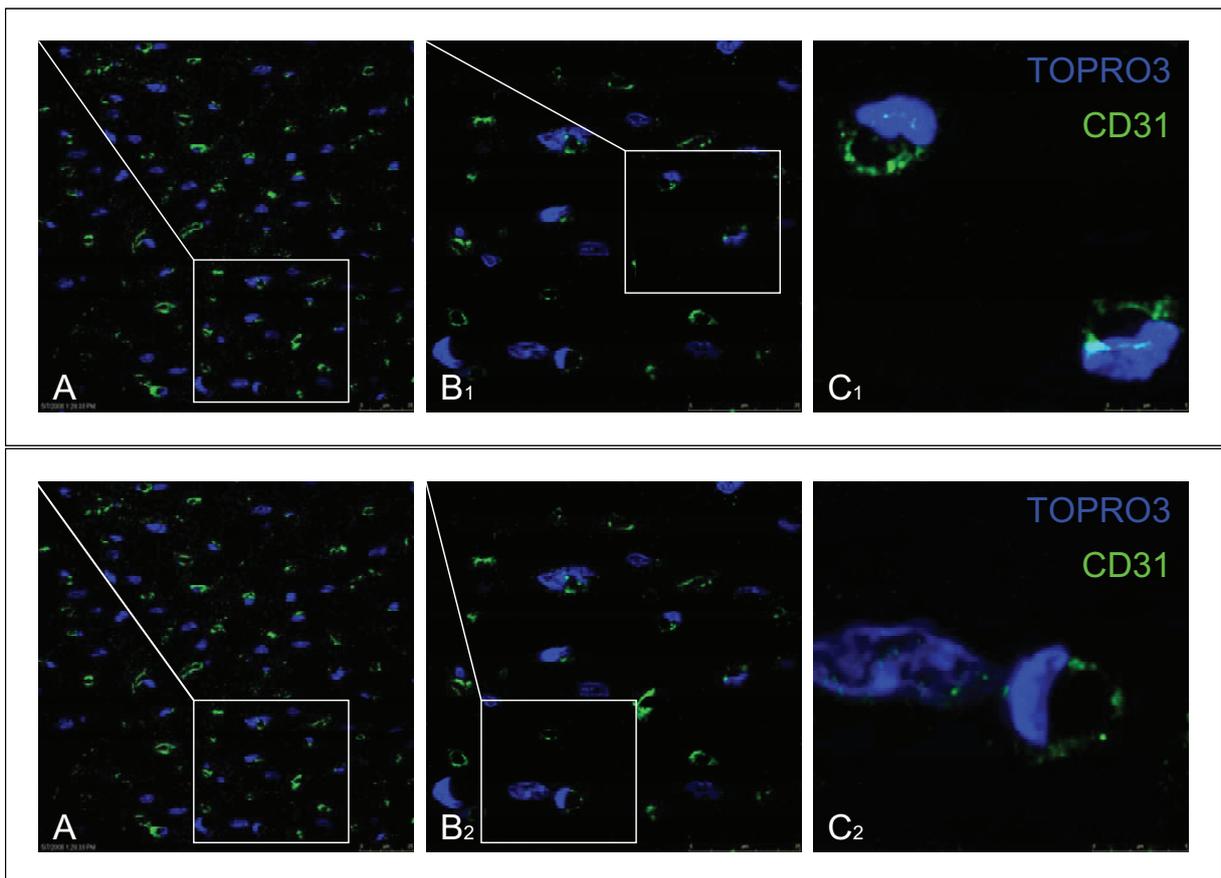
**Abb. 25:** Die Auswertung der interstitiellen Fibrose in der Region der Erweiterungsplastik und 1 cm unterhalb der Erweiterungsplastik ergab im Vergleich beider Gruppen keinen signifikanten Unterschied.

### 3.10.3 Kapillardichte

Die mikroskopische Auswertung der Schnitte in der CD31-Immunfluoreszenz-Färbung ermöglichte eine quantitative Aussage über die Anzahl der Kapillaren pro  $\text{mm}^2$ . Die Kapillardichte war bei der Zellgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe in beiden Ebenen signifikant erhöht (Abb. 26). In der Region um die Erweiterungsplastik wurde für die Zellgruppe eine Kapillardichte von  $846,3 \pm 22,7$  Kapillaren/ $\text{mm}^2$  und für die Kontrollgruppe ein Wert von  $738,8 \pm 10,5$  Kapillaren/ $\text{mm}^2$  ermittelt ( $p < 0,001$ ). In dem Areal in 1 cm Entfernung zur Erweiterungsplastik ergaben sich für die Zellgruppe  $918,9 \pm 17,7$  Kapillaren/ $\text{mm}^2$  sowie für die Kontrollgruppe  $721,8 \pm 10,9$  Kapillaren/ $\text{mm}^2$  ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 26:** Die Auszählung der Kapillaren pro mm<sup>2</sup> ergab im Gruppenvergleich in beiden Regionen (B) einen signifikanten Unterschied. Die Zellgruppe (Bild A, 400er Vergrößerung) imponiert in beiden Arealen mit einer signifikant erhöhten Kapillardichte im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 27:** 6-fache sequentielle Ausschnittsvergrößerungen ( $B_{1/2}$  und  $C_{1/2}$ ) des Gewebes der Zellgruppe aus einer 600er Vergrößerung (A). In der maximalen Vergrößerung (C) sind in der oberen Serie zwei gegenüberliegende Kapillaren ( $C_1$ ) und in der unteren Serie eine Kapillare ( $C_2$ ), die an einen Myozyten grenzt, erkennbar.

## **4. Diskussion**

Das Ziel der Studie war es, die Effektivität der intramyokardialen Applikation von autologen mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes im Therapieansatz bei chronischer rechtsventrikulärer Volumenbelastung zu untersuchen. Ein weiterer Schwerpunkt war die Entwicklung eines neuen Modells zur chirurgischen Induktion einer rechtsventrikulären Volumenbelastung mit klinischer Relevanz im Großtiermodell. Nach unserem Erkenntnisstand ist dies die erste Studie, die die Effekte der intramyokardialen Transplantation autologer mononukleärer Zellen aus dem Nabelschnurblut auf die rechtsventrikuläre Funktion in einem experimentellen Modell mit chronischer Volumenbelastung des rechten Ventrikels untersucht. Unsere experimentelle Studie am Schafsmodell hat gezeigt:

- 1) Die chirurgische Induktion einer Pulmonalklappeninsuffizienz, herbeigeführt durch die Infundibulotomie des rechten Ventrikels und die Implantation einer transanulären Erweiterungsplastik auf dem RVOT, ist ohne Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine möglich. Die experimentelle Methode stellt ein geeignetes Modell für die akute und chronische rechtsventrikuläre Volumenbelastung dar.
- 2.) Die intramyokardiale Applikation von Stammzellen des Nabelschnurblutes erweist sich in diesem Modell als sicher und effektiv.
- 3.) Die intramyokardiale Transplantation von mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes führt in diesem Modell zu einer Verbesserung der diastolischen Herzfunktion. Der Effekt der Stammzellen ist in der Induktion der Neoangiogenese zu vermuten.

### **4.1 Klinische Relevanz**

Die Entwicklung neuer Therapieansätze für die Behandlung des erkrankten Myokards stellt auf dem Gebiet der regenerativen Medizin ein anspruchsvolles Ziel dar. Es gibt eine Vielzahl an Veröffentlichungen über experimentelle und klinische Studien, die nach der Applikation von Stammzellen eine Verbesserung der myokardialen Leistung beschrieben haben [40, 47, 49, 52, 83]. Bezüglich der myokardialen Erkrankungen richten sich die Bemühungen der stammzell-basierten-Therapien v.a. auf die akute und die chronische Ischämie des Myokards. Das Potential der Zelltherapie zur Behandlung angeborener Herzfehler ist bis heute nicht ausreichend beachtet worden. In Deutschland werden pro Jahr circa 6000 Kinder mit einer Fehlbildung des Herzens oder der großen Gefäße geboren. Unter den Fehlbildungen haben die angeborenen Herzfehler die höchste Sterberate [1]. Die Fortschritte in der modernen Medizin haben es ermöglicht, dass heutzutage circa 90% der Patienten mit angeborenem Herzfehler das Erwachsenenalter erreichen.

Nach den Operationen ist die Lebensqualität der Patienten jedoch häufig durch Restbefunde oder Folgeerkrankungen eingeschränkt. Die Korrektur der Fallot'schen Tetralogie repräsentiert hierbei einen wesentlichen Erfolg in der Chirurgie der angeborenen Herzfehler [16]. Trotz der hervorragenden frühen postoperativen Resultate [17] werden die Langzeitergebnisse dennoch durch die rechtsventrikuläre Volumenbelastung limitiert [5, 9]. Die Schlüsselrolle in der Genese der rechtsventrikulären Volumenbelastung nach der Korrektur wird der chronischen Pulmonalklappeninsuffizienz zugesprochen, die durch die veränderte Wandkinetik nach Rekonstruktion des RVOT [10, 32] und die Infundibulotomie zur Erweiterung des RVOT getriggert wird [4, 10, 27, 84]. Eine Nachlasterhöhung des Ventrikels durch stenotische oder hypoplastische Lungengefäße steht ebenfalls in der Diskussion [30]. Die rechtsventrikuläre Volumenbelastung mündet langfristig in einer Dysfunktion des rechten Ventrikels und trägt somit wesentlich zur Mortalität und Morbidität der Patienten bei [84]. Die Ursache für eine Reoperation nach der Korrektur der Fallot'schen Tetralogie ist in der Kausalität zwischen der langjährig bestehenden Pulmonalklappeninsuffizienz und der daraus resultierenden späten rechtsventrikulären Dysfunktion zu finden [10]. Klinische Daten belegen, dass die rechtsventrikuläre Volumenbelastung aufgrund der Pulmonalklappeninsuffizienz oft über Jahre gut toleriert werden kann [5, 16]. Durch Zunahme der Herzgröße und Progredienz der Pulmonalklappeninsuffizienz weicht die Belastbarkeit der Patienten jedoch deutlich von der einer Normalbevölkerung ab [27]. Die ersten Anzeichen einer rechtsventrikulären Dysfunktion sind klinisch leider kaum auffällig. Die Erforschung der Morphologie des rechten Ventrikels, der rechtsventrikulären Funktion und der Adaptationsmechanismen sind in Bezug auf die angeborenen Herzfehler von großer Bedeutung.

Die Stammzelltherapie birgt ein enormes Potential für die regenerative Medizin. Eine unterstützende stammzell-basierte-Therapie bei der Behandlung angeborener Herzfehler wäre wünschenswert und würde in der Kombination mit der chirurgischen Therapie vielversprechende innovative Ansätze aufzeigen [71]. Bisher wurden Stammzellen verschiedenen Ursprungs vorzugsweise für regenerative Ansätze bei Erkrankungen des Myokards bei erwachsenen Patienten herangezogen [85, 50]. Die Stammzellen des Nabelschnurblutes rücken derzeit zunehmend in das Interesse der Öffentlichkeit, da das Blut unter der Geburt einfach, komplikationslos und schmerzfrei entnommen werden kann. Den Stammzellen des Nabelschnurblutes werden ein erhöhtes Potential für angiogenetische und myogene Differenzierung sowie ausgezeichnete proliferative Eigenschaften zugesprochen [51, 66, 60, 70]. Bei der Behandlung hämatopoetischer Erkrankungen hat sich die Therapie mit Stammzellen des Nabelschnurblutes bereits etabliert [58, 65, 66].

Die Stammzellen des Nabelschnurblutes werden unter der Geburt entnommen und kryokonserviert gelagert, bis sie auf Anforderung und mit Einverständnis der Familien zur autologen oder heterologen Therapie eingesetzt werden können. Die heterologe Anwendung von Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (NSB) soll ein geringeres Risiko für Graft-versus-Host-Reaktion bzw. Immunreaktion mit sich bringen [58]. In verschiedenen Ansätzen wurden die mononukleären Zellen (MNC) aus dem NSB für die myokardiale Regeneration verwendet. Nach der Applikation dieser Stammzellen im experimentellen Infarktmodell wird von einer verringerten Infarktgröße [57], einer verminderten Kollagendeposition [57], einer erhöhten Kapillardichte [52, 53, 57], einer verbesserten kardialen Funktion [52, 53] und der Detektion der Zellen im Myokard [52, 57], im Narbengewebe [53] sowie bis zu 1% in der Gefäßwand [53] berichtet. Bis heute fehlen Literaturangaben über experimentelle in-vivo-Modelle, die einerseits die rechtsventrikuläre Volumenbelastung mit klinischer Relevanz nach Korrekturoperation der Fallot'schen Tetralogie thematisieren und andererseits den Effekt der Stammzellbehandlung bei chronischer rechtsventrikulärer Volumenbelastung aufzeigen. Unser Modell stellt einen neuen experimentellen Ansatz zur Erweiterung des RVOT ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine dar. Die Implantation einer transanulären Erweiterungsplastik auf dem RVOT und die Zerstörung der Pulmonalklappe durch die Inzision des Anulus führten zu einer rechtsventrikulären Volumenbelastung, die der nach korrigierter Fallot'scher Tetralogie ähnlich war. Schon 1914 wurde von experimentellen Bemühungen berichtet, die aortale oder pulmonale Klappenöffnung zu vergrößern und den RVOT mittels Venograft zu erweitern [86]. Auf dem Gebiet der myokardialen regenerativen Medizin ist die vorgelegte Arbeit, nach unserem Kenntnisstand, die erste Studie, die die intramyokardiale Transplantation autologer mononukleärer Zellen aus dem Nabelschnurblut, die Betrachtung des rechten Ventrikels und die Chirurgie angeborener Herzfehler kombiniert. Mononukleäre Zellen aus dem Nabelschnurblut wurden erfolgreich isoliert und auf der Seite der Infundibulotomie, im Bereich der Erweiterungsplastik, in das rechtsventrikuläre Myokard transplantiert. Bezug nehmend auf frühere Studien, die den Gehalt an CD34-positiven Zellen im humanen Nabelschnurblut bestimmten [52, 57], können wir hinzufügen, dass auch im Nabelschnurblut des Schafes über 1% an CD34-positiven Zellen zu finden sind. CD34 ist ein bekannter Marker für hämatopoetische Stammzellen, Satellitenzellen und endotheliale Progenitorzellen [73, 74]. Das Vorkommen endothelialer Progenitorzellen im Nabelschnurblut konnte durch die in-vitro-Kultivierung mit speziellem Medium bestätigt werden. In der Kultur konnten AcLDL positiv gefärbte Zellen nachgewiesen werden.

## 4.2 Validität der Methode

Der Erfolg des Konzeptes, eine Volumenbelastung des rechten Ventrikels zu verursachen, konnte durch die Echokardiographie, die Konduktanz-Katheter-Messungen und die makroskopische Beurteilung hinreichend belegt werden.

**Akute Volumenbelastung:** Die frühen Konduktanz-Katheter-Analysen gaben Aufschluss über den akuten Effekt der chirurgisch induzierten Pulmonalklappeninsuffizienz.

Es zeigte sich, dass die RVEF nach der Inzision des RVOT und dem Aufbringen der transanulären Erweiterungsplastik signifikant abfiel. Des Weiteren wurden direkte Auswirkungen des chirurgischen Eingriffs auf den rechtsventrikulären Druck beobachtet, verdeutlicht durch den Anstieg von  $P_{\max}$ ,  $P_{es}$  und EDP sowie  $dp/dt_{\max}$ , einem Parameter für die Kontraktilität des Herzens. Die Betrachtung der Volumenwerte ergab weiterhin einen akuten Anstieg des ESV, SV und HZV sowie EDV. Diese Konstellation der Werte, die eine Volumenbelastung des RV aufzeigt, gibt Auskunft über den Erfolg des experimentellen chirurgischen Modells. Auch in der Klinik können ein Anstieg der Volumenparameter EDV, ESV, SV und HZV [9] sowie ein Abfall der EF [9, 11] direkt nach der chirurgischen Korrektur der Fallot'schen Tetralogie beobachtet werden. Die Übereinstimmungen unseres Modells der rechtsventrikulären Volumenbelastung mit den hämodynamischen Veränderungen nach der Korrektur der Fallot'schen Tetralogie bekräftigt die klinische Relevanz der Studie. Die akute kompensatorische Antwort des RV auf die induzierte Volumenbelastung mit Zunahme des ESV und des EDV ist eine reaktive Erhöhung der systolischen Eigenschaften,  $P_{\max}$  und  $dp/dt_{\max}$ , gemäß dem Frank-Starling-Mechanismus. Die vorlastabhängige Erhöhung der Ventrikelspannung führt zu einer Empfindlichkeitserhöhung der Myofilamente für Calcium und somit zur Zunahme der Inotropie bzw. des  $dp/dt_{\max}$ -Wertes [87, 88]. Die akute rechtsventrikuläre Volumenbelastung soll ebenfalls von Veränderungen im myokardialen Genexpressionsprofil begleitet sein [89].

**Echokardiographie:** Die durchgeführte Echokardiographie bestätigte den Erfolg des experimentellen Vorgehens. Bei allen operierten Tieren konnte eine Pulmonalklappeninsuffizienz der Grade 2 bis 3, ohne statistischen Unterschied zwischen den Gruppen, nachgewiesen werden. Sowohl die Darstellung als auch die adäquate funktionale Quantifizierung des RV mit Hilfe der transthorakalen Echokardiographie sind bekanntlich anspruchsvoll. Aus diesem Grund sollten die Volumenparameter, die in der Echokardiographie gewonnen wurden mit gewissem Vorbehalt betrachtet werden.

**Chronische Volumenbelastung:** Die Auswirkungen der induzierten Volumenbelastung, dem Hauptrisikofaktor nach der chirurgischen Korrektur der Fallot'schen Tetralogie für die Morbidität und die Mortalität der Patienten, wurden am Ende der 3-monatigen Studie erneut betrachtet.

Obwohl die Veränderungen des Herzzeitvolumens und des Schlagvolumens in der Kontrollgruppe ausgeprägter erschienen, konnte bzgl. der Herzfunktion in Ruhe kein signifikanter Unterschied zur Zellgruppe festgestellt werden. In unserem Modell erwarteten wir aufgrund eines nur mäßigen Grades der Pulmonalklappeninsuffizienz in einem verhältnismäßig kurzen Zeitintervall von 3 Monaten keine gravierenden Abweichungen der rechtsventrikulären Herzfunktion. Dementsprechend war es nicht überraschend, dass im Gruppenvergleich für die rechtsventrikuläre Herzfunktion ähnliche Werte ermittelt wurden, wenngleich sie in der Kontrollgruppe ausgeprägter erschienen.

Ein interessanter Aspekt der hämodynamischen Analysen nach 3 Monaten ist die Wiederherstellung der nativen Druck- und Volumenwerte des rechten Ventrikels in den Ruhemessungen bei beiden Gruppen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der akuten Volumenbelastung wurden in den Ruhemessungen nach 3 Monaten keine signifikanten Unterschiede für das ESV, das EDV, den EDP, den  $dp/dt_{max}$ -Wert und die EF im Vergleich zu den präoperativen Werten ermittelt. Signifikante Veränderungen zeigten sich lediglich in einer Abnahme des Herzzeitvolumens und des Schlagvolumens. Die Konstellation der Werte lässt eine kompensierte Volumenbelastung des rechten Ventrikels erkennen. Der Nachweis der Pulmonalklappeninsuffizienz mit den Graden 2 bis 3 in der Echokardiographie nach 6 Wochen sowie die postmortalen makroskopischen Auswertungen schließen die Rückbildung der chirurgisch induzierten Pulmonalklappeninsuffizienz aus. Es kann geschlussfolgert werden, dass die chronische Volumenbelastung per se die rechtsventrikuläre Kontraktilität in Ruhe nicht beeinträchtigt. Die Arbeitsgruppe um Ishibashi berichtete, dass die chronische Volumenbelastung bei Trikuspidalklappeninsuffizienz auch nach 3 bis 4 Jahren hinsichtlich des Ausmaßes und der Geschwindigkeit der Sarkomerverkürzung im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Unterschied aufwies [90].

***Systolische Funktion im Dobutamin-Stress-Test:*** Unter Dobutamin-Stress-Bedingungen zeigte sich, dass die Zellgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich bessere Kontraktilität des rechten Ventrikels mit signifikant höheren Werten für  $dp/dt_{max}$  aufweist. Bezug nehmend auf unser Modell sollte festgehalten werden, dass neben der Implantation der Erweiterungsplastik eine Infundibulotomie erfolgte, die zu Abnahme der Kontraktilität in diesem Areal geführt haben könnte. Diese infundibulären Kinetikstörungen könnten die systolischen Eigenschaften beeinflusst haben, die in der Zellgruppe weniger beeinträchtigt erscheinen. Auch die Arbeitsgruppe um d'Udekem misst dem pulmonalen Infundibulum aufgrund seiner Wichtigkeit für die komplette rechtsventrikuläre Ejektion und die Funktionalität der Pulmonalklappe eine besondere Bedeutung bei [10, 30]. Ein weiterer Grund für die Abweichungen der systolischen Funktion könnte aufgrund des chronischen Volumenstresses in zellulären Veränderungen der Kalziumhomöostase zu finden sein [87].

Es ist bekannt, dass im geschädigten Myokard eine Dysregulation der Kalziumsensitivität der Myofilamente sowie eine veränderte intrazelluläre Kalziumhomöostase vorliegen [88]. Szabo et al. untersuchten die Adaptationsmechanismen des chronisch volumenbelasteten Herzens auf eine Druckbelastung. Während die Nachlasterhöhung im gesunden Herzen zu einer Kontraktilitätssteigerung aufgrund einer veränderten intrazellulären Kalziumhomöostase (homeometrische Autoregulation) führte, reagierte das volumenbelastete Herz gemäß dem Frank-Starling-Mechanismus [91].

Pasipularides et al. gehen davon aus, dass auch eine abnormale diastolische rechtsventrikuläre Funktion die systolische Funktion beeinflusst und gegebenenfalls Auswirkungen auf die Adaptation an pathologische Gegebenheiten zeigt [92]. Eine diastolische Dysfunktion konnte auch in gestressten humanen Herzen beobachtet werden [93].

**Diastolische Funktion im Dobutamin-Stress-Test:** Unter Dobutamin-Stress-Bedingungen zeigten sich in unserem Modell der rechtsventrikulären Volumenbelastung die Unterschiede zwischen den Gruppen v.a. in der diastolischen Funktion des Herzens. Der ermittelte Wert für  $dp/dt_{\min}$  unter Dobutamin-Stress-Bedingungen verdeutlicht im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verbesserte frühe diastolische Relaxation in der Zellgruppe. Eine klare Aussage über die Elastizität des rechten Ventrikels konnte durch die Beurteilung der EDPVR im Zusammenhang mit ihrem Anstieg getroffen werden. Unter Dobutamin-Stress-Bedingungen zeigte sich in der Zellgruppe eine Verschiebung der Geraden der EDPVR nach rechts unten. Die Verlagerung der Werte der EDPVR spiegelt eine erhöhte Elastizität des rechten Ventrikels nach der Behandlung mit mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut wider. Der in der Zellgruppe beobachtete Anstieg des Kontraktilitätsmarkers  $dp/dt_{\max}$  und der Indices für die Elastizität, der  $dp/dt_{\min}$ -Wert und der Eed-Wert, sind Ausdruck einer im Vergleich zur Kontrollgruppe besseren Anpassung des Herzens an die Belastung.

### **4.3 Effektivität und Sicherheit der intramyokardialen autologen Transplantation der mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut**

**Mikroskopische Auswertung:** Von den Auswertungen der Gewebeschnitte erhofften wir, Hinweise auf ein morphologisches Korrelat für die gemessene verbesserte kardiale Funktion in der Zellgruppe zu erhalten. Die Immunhistochemie mit dem CD-31 Antikörper ergab eine signifikant höhere Kapillardichte in der Zellgruppe. Die erhöhte Kapillardichte kann eine verbesserte Perfusion des Myokards im transplantierten Areal vermuten lassen. Dieses Faktum liefert eine mögliche Erklärung für die bessere diastolische Funktion in der Zellgruppe. Der Nachweis von Endothelzellen in der primären Kultur des Nabelschnurblutes lässt eine entscheidende Rolle dieser Zellen im Prozess der Angiogenese vermuten.

Es wird berichtet, dass nach der Injektion von mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes in die Schwanzvene einer Maus die Kapillardichte in der Grenzzone des Infarktareals erhöht war und perivaskulär Zellnester gefunden wurden, deren Zellen aus dem Nabelschnurblut stammten [57]. In Übereinstimmung mit der Literatur [53, 57] deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass dem rechtsventrikulären Remodelling nach der Infundibulotomie eine wichtige Rolle zukommt. Verschiedene Stammzelltypen sollen das kardiale Remodelling beeinflussen und somit positive Auswirkungen auf die kardiale Funktion erzielen [48, 71].

Es ist bereits bekannt, dass Stammzellen die Produktion proinflammatorischer Mediatoren im ischämischen Myokard reduzieren und einen protektiven Effekt ausüben [73]. Eine ähnliche parakrine Wirkung der applizierten mononukleären Zellen auf das volumenbelastete Myokard ist zu vermuten. Unter dem kardialen Remodelling wird ein komplexer Prozess verstanden, der durch die Akkumulation von interstitiellem und perivaskulärem Kollagen charakterisiert werden kann [94]. Dem gegenüber soll bei dem kardialen Remodelling nach Volumenbelastung keine abnorm hohe Kollagenkonzentration zu erwarten sein [94, 95]. In unserer Studie zeigte das Ausmaß der fibrotischen Fläche keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Das durchschnittliche fibrotische Areal in der Region um die Erweiterungsplastik herum betrug in beiden Gruppen 2,7%. Im Vergleich zur myokardialen Fibrose in Infarktmodellen kann der Wert von 2,7% als geringer angesehen werden. Gegenüber dem gesunden Myokard, das nur  $1,9 \pm 0,1\%$  an interstitiellem Kollagen enthält [96], erscheint der Wert jedoch erhöht. Der leicht erhöhte Wert kann auf eine beginnende Fibrosierung hindeuten. Das Vorkommen endomyokardialer Fibrose konnte bei Patienten mit Fallot'scher Tetralogie [97] und in Tiermodellen aufgezeigt werden [98]. Es ist auch bekannt, dass der Grad der Fibrosierung mit fortschreitendem Alter zunimmt [22, 97]. Möglicherweise reduziert der derzeitige vorherrschende Trend der frühen Korrektur das Risiko der endomyokardialen Fibrose [31]. Ob die Stammzelltherapie in einem längeren Beobachtungszeitraum einen Einfluss auf die Fibrogenese gezeigt hätte, bleibt ungeklärt. Die Ergebnisse zeigen, dass die bessere Herzfunktion der Zellgruppe wahrscheinlich nicht mit einer verringerten Fibrogenese erklärt werden kann.

***Intramyokardiale Transplantation der MNC des NSB:*** Nach den 3 Monaten zeigten weder die histologischen und makroskopischen Auswertungen noch die Befunde der Computertomographie einen nachteiligen Gewebeumbau durch die Stammzelltherapie. Die gewählte intramyokardiale Applikation der mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes erwies sich als sicher und effektiv. Die Vorteile der lokalen Stammzellapplikation werden in der geringeren Zellzahl, die zur Transplantation notwendig wäre, gesehen [67]. Von der endokardialen Applikation wurde berichtet, dass sie gut toleriert werde [99], eine gute Wirksamkeit bei der Therapie der chronisch ischämischen Herzkrankheit in der Phase-1-Studie [100] besitze und eine Reduktion des systemischen Effektes erziele [99].

Demgegenüber wurde von der intrakoronaren Applikation mesenchymaler Stammzellen berichtet, dass sie zur Behandlung von Myokardinfarkten ungeeignet sei. Nach der intrakoronaren Injektion konnte der sogenannte „no-reflow“, d.h. ein verminderter distaler Blutfluss, vermutlich basierend auf Mikroinfarkten durch Obstruktion, beobachtet werden [99, 100]. Des Weiteren besteht bei der lokalen Applikation ein erhöhtes Risiko für die Perforation des dünnen Myokards der freien Wand des rechten Ventrikels.

Um diese Komplikation während der intramyokardialen Injektion der mononukleären Zellen zu vermeiden, benutzten wir eine spezielle, handgefertigte zweistufige Nadel. Borenstein et al. implantierten autologe myogene Zellen in das Myokard des rechten Ventrikels nach Bündelung der Pulmonalarterie, wobei zwei Versuchstiere an den Folgen der intramyokardialen Injektion verstarben. Es wurde zudem eine vermehrte kardiale Ödembildung beschrieben [77]. Diese Komplikation beobachteten wir in unserem Modell nicht. Bei der intramyokardialen Injektion sollte nicht nur auf die Anzahl der Injektionen und die applizierte Menge geachtet werden, sondern auch auf die sorgfältige Auswahl des Instrumentariums zur Applikation.

**Laborchemische Parameter:** Die Analyse der Blutwerte zeigte zwischen den einzelnen Messzeitpunkten geringe Abweichungen im Gruppenvergleich, die jedoch keiner klinischen Bewertung bedürfen. Die Unterschiede innerhalb der Gruppe können durch den Versuchsablauf erklärt werden. Die Schwankungen des Laktat-Wertes beruhen auf der 24-Stunden Nüchternstellung der Tiere vor Beginn der Operation sowie dem durch Erkrankung des respiratorischen Systems geprägten postoperativen Verlauf. Der Leukozytenanstieg ist im Zusammenhang mit dem Eingriff zu sehen. Die Ursachen für den Hk-Anstieg, den Thrombozyten-Anstieg und die Elektrolytschwankungen könnten in der postoperativen verminderten Flüssigkeitsaufnahme zu finden sein. Der Anstieg der Enzyme Kreatinkinase und Laktatdehydrogenase erklärt sich durch die iatrogene Zerstörung von Muskelgewebe während des operativen Eingriffs. Alle Parameter lagen größtenteils im Bereich der Normwerte. Diskrete Abweichungen sind selten zu finden, so dass den gefundenen Unterschieden keine pathologische Bedeutung zukommt.

#### **4.4 Grenzen der Studie**

Die Größe der Stichprobe war zur Aussage über die Signifikanz in der statistischen Analyse ausreichend, vielleicht jedoch zu gering, um reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen.

Die Konduktanz-Katheter-Methode ist zur Einschätzung der LV-Volumetrie bereits etabliert, wird aber für die Analyse der rechtsventrikulären Funktion in der Literatur kontrovers diskutiert. Der rechte Ventrikel zeigt keine ellipsoide Geometrie auf, was als Grundlage für die Kalkulation der volumetrischen Parameter vorausgesetzt wird [12].

Dennoch wird die Konduktanz-Katheter-Methode als aussagekräftigste Methode zur differenzierten Funktionsanalyse akzeptiert. Alternativ könnte das MRT eine detailliertere Abschätzung der rechtsventrikulären Funktion liefern. Um qualitativ bessere Bilder zu erlangen, wären Phasen der Apnoe von Bedeutung gewesen. Für eine willkürlich herbeigeführte Apnoe der Tiere wären eine Intubationsnarkose sowie ein MRT-kompatibles Beatmungsgerät für Großtiere erforderlich gewesen. Darauf musste zum Zeitpunkt der Untersuchung aus logistischen Gründen verzichtet werden.

Die Wirkung der implantierten Zellen wird v.a. in der Neoangiogenese gesehen, auch wenn die Beweisführung, dass die transplantierten autologen Zellen nach 3 Monaten im Myokard verbleiben, nicht erbracht werden konnte. Eine Markierung der Zellen hätte weitere Prozeduren an den Zellen erfordert, so dass mit Zellverlusten bei der Aufbereitung zu rechnen gewesen wäre. Dieses Risiko sollte in Anbetracht der geringen Zellzahl vermieden werden. Der Aspekt der Abstoßungsreaktion der implantierten Zellen entfiel aufgrund des autologen Versuchsansatzes. Ob die erhöhte Angiogenese ein direkter Effekt der Zelltransplantation ist oder auf eine Beeinflussung der residenten Stammzellen durch die applizierten mononukleären Zellen zurückgeführt werden kann, bedarf noch der Klärung.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen ein großes Potential von mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes für die Behandlung der angeborenen Herzfehler auf. Das Modell der chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung kann jedoch nicht kritiklos auf das Krankheitsbild der Fallot'schen Tetralogie übertragen werden. Bei der Fallot'schen Tetralogie liegt aufgrund der Obstruktion des RVOT eine Hypertrophie des rechten Ventrikels vor, die bei den primär gesunden Herzen in unserer Studie nicht vorhanden war. Um einen eindeutigen Zusammenhang zwischen unserem Modell und der Klinik bei Fallot'scher Tetralogie herzustellen, hätte der rechtsventrikulären Volumenbelastung eine Druckbelastung des rechten Ventrikels vorausgehen müssen. Ein zweizeitiges Vorgehen mit Bändelung der Pulmonalarterie, zur Herbeiführung der rechtsventrikulären Hypertrophie, und Induktion der Pulmonalklappeninsuffizienz wäre erforderlich gewesen. Ein weiterer Eingriff dieser Schwere hätte eine noch höhere Belastung für das Tier bedeutet und hätte erheblichen Einfluss auf die Mortalität und die Morbidität gehabt. Dieses Risiko wurde bewusst nicht eingegangen. Das Modell bedarf weiterer Erforschung, bevor es in das Behandlungskonzept der angeborenen Herzfehler integriert werden kann.

## 5. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die rechtsventrikuläre Dysfunktion ist eine unabdingbare Folge der chronischen Volumenbelastung des rechten Ventrikels (RV).

**Zielstellung:** Ziel der Studie war es, die Effekte der intramyokardialen, autologen Transplantation von mononukleären Zellen (MNC) des Nabelschnurblutes (NSB) in einem neuen Modell der chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung zu untersuchen.

**Methoden:** 4 Monate alte Hausschafe wurden in die Zellgruppe (n=10) und die Kontrollgruppe (n=10) verteilt. Jedes Tier wurde zwei Operationen unterzogen. In dem ersten Eingriff erfolgte die Implantation der transanulären Erweiterungsplastik (TAP) auf den rechtsventrikulären Ausflusstrakt (RVOT) und die Zerstörung des Pulmonalklappenringes über eine Infundibulotomie ohne Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine. Konduktanz-Katheter-Messungen wurden zur Validierung der induzierten Pulmonalklappeninsuffizienz herangezogen. In die Region um die TAP wurden in der Zellgruppe die MNC des NSB ( $8,2 \pm 6,3 \times 10^7$ ) intramyokardial in die freie Wand des RV injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt Injektionen mit IMDM-Medium. Die MNC wurden nach der FACS-Analyse für das CD34-Antigen zwei Wochen lang in Endothelzellmedium kultiviert. Eine transthorakale Echokardiographie erfolgte in der 6. Woche und eine kardiale Computertomographie in der 10. bis 12. Woche postoperativ. Nach 3 Monaten wurde die rechtsventrikuläre Herzfunktion sowohl in Ruhe als auch unter Dobutamin-Stress mit dem Konduktanz-Katheter gemessen. Die Herzen wurden explantiert und makroskopisch, mikroskopisch sowie immunhistologisch beurteilt.

**Ergebnisse:** Die in-vitro-Analyse der Zellen ergab  $1,2 \pm 0,2\%$  CD34-positive Zellen innerhalb der isolierten mononukleären Zellfraktion des Endprodukts und zeigte, dass AcLDL-positive Endothelzellen kultiviert werden konnten. Unter den Versuchstieren verursachte der chirurgische Eingriff keine Mortalität. Die Dobutamin-Stress-Messung nach 3 Monaten zeigte in der Zellgruppe eine signifikant verbesserte diastolische Funktion und eine erhöhte maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit gegenüber der Kontrollgruppe ( $dp/dt_{\min}$ :  $p=0,043$ ,  $E_{ed}$ :  $p=0,009$ ,  $dp/dt_{\max}$ :  $p=0,003$ ). In der Echokardiographie konnte bei den Tieren ein Insuffizienzgrad 2 bis 3 der Pulmonalklappe befundet werden. Unerwünschte Gewebeformationen wurden im rechtsventrikulären Myokard nicht beobachtet. Die Immunhistologie mit CD31 zeigte in der Zellgruppe eine signifikante Erhöhung der Kapillardichte in der Region der Zelltransplantation ( $p<0.01$ ).

**Schlußfolgerung:** Die Implantation der TAP und die Zerstörung des Pulmonalklappenringes stellt ein wertvolles Großtiermodell für die chronische rechtsventrikuläre Volumenbelastung dar. Der chronisch volumenbelastete RV profitiert von der intramyokardialen, autologen Transplantation der MNC des NSB, was auf eine Induktion der Neoangiogenese durch die applizierten MNC hindeuten könnte.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1) U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health. Medline Plus. Congenital Heart Disease page. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001114.htm>. Accessed January 2008.
- 2) Odland HH, Thaulow EM. Heart failure therapy in children. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006;4:33-40.
- 3) Shimazaki Y, Blackstone EH, Kirklin JW. The natural history of isolated congenital pulmonary valve incompetence. Surgical implications. *Thorac Cardiovasc Surg* 1984;32:257-259.
- 4) Gregg D, Foster E. Pulmonary insufficiency is the nexus of late complications in tetralogy of Fallot. *Curr Cardiol Rep* 2007;9:315-322.
- 5) Bouzas B, Kilner PJ, Gatzoulis MA. Pulmonary regurgitation not a benign lesion. *Eur Heart J* 2005;26:433-439.
- 6) Gatzoulis MA, Balaji S, Webber SA, Siu SC, Hokanson JS, Poile C, Rosenthal M, Nakazawa M, Moller JH, Gillette PC, Webb GD, Redington AN. Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot: a multicenter study. *Lancet* 2000;356:975-981
- 7) Shah A, Atkins BZ, Hata JA, Tai O, Kypson AP, Lilly RE, Koch WJ, Glower DD. Early effects of right ventricular volume overload on ventricular performance and  $\beta$ -adrenergic signaling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:342-349.
- 8) Davlouros PA, Niwa K, Webb G, Gatzoulis MA. The right ventricle in congenital heart disease. *Heart* 2006;92:27-38.
- 9) Lange PE, Onnasch DGW, Bernhard A, Heintzen PH. Left and right ventricular adaption to right ventricular overload before and after surgical repair of tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol* 1982;50:786-794.

- 10) d'Udekem Y, Ovaert C, Grandjean F, Gerin V, Cailteux M, Shango-Lody P, Vliers A, Sluysmans T, Robert A, Rubay J. Tetralogy of Fallot: Transannular and right ventricular patching equally affect late functional status. *Circulation* 2000;102:111-116.
- 11) Oku H, Shirotani H, Sunakawa A, Yokoyama T. Postoperative long-term results in total correction of tetralogy of Fallot: hemodynamics and cardiac function. *Ann Thorac Surg* 1986;41:413-418.
- 12) Grothues F, Moon JC, Bellenger NG, Smith GS, Klein HU, Pennell DJ. Interstudy reproducibility of right ventricular volumes, function and mass with cardiovascular magnetic resonance. *Am Heart J* 2004;147:218-223.
- 13) Pozzi M, Trivedi DB, Kitchiner D, Arnold RA. Tetralogy of Fallot: what operation at which age. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 2000;17:631-636.
- 14) Groh MA, Meliones JN, Bove EL, Kirklin JW, Blackstone EH, Lupinetti FM, Snider AR, Rosenthal A. Repair of tetralogy of Fallot in infancy: effect of pulmonary artery size on outcome. *Circulation* 1991;84:206-212.
- 15) Di Donato RM, Jonas RA, Lang P, Rowe JJ, Castaneda AR. Neonatal repair of tetralogy of Fallot with and without pulmonary atresia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;101:126-137
- 16) Redington AN. Physiopathology of right ventricular failure. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Ann* 2006;9:3-10.
- 17) Alexiou C, Mahmoud H, Al-Khaddour A, Gnanapragasam J, Salmon AP, Keeton BR, Monro JL. Outcome after repair of tetralogy of Fallot in the first year of life. *Ann Thorac Surg* 2001;71:494-500.
- 18) Sousa Uva M, Chardigny C, Galetti L, Lacour Gayet F, Roussin R, Serraf A, Bruniaux J, Touchot A, Planché C. Surgery for tetralogy of Fallot at less than six months of age: Is palliation "old-fashioned"? *Eur J Cardio-Thorac Surg* 1995;9:453-460.
- 19) Pigula FA, Khalil PN, Mayer JE, del Nido PJ, Jona RA. Repair of tetralogy of Fallot in neonates and young infants. *Circulation* 1999;100:157-161.

- 20) Walsh EP, Rockenmacher S, Keane JF, Hougen TJ, Lock JE, Castaneda AR. Late results in patients with tetralogy of Fallot repaired during infancy. *Circulation* 1988;77:1062-1067.
- 21) Kaulitz R, Jux C, Bertram H, Paul T, Ziemer G, Hausdorf G. Primary repair of tetralogy of Fallot in infancy – The effect of growth of the pulmonary arteries and the risk for late reinterventions. *Cardiol Young* 2001;11:391-398.
- 22) Norgård G, Gatzoulis MA, Moraes F, Lincoln C, Shore DF, Shinebourne EA, Redington AN. Relationship between type of outflow tract repair and postoperative right ventricular diastolic physiology in tetralogy of Fallot. *Circulation* 1996;94:3276-3280.
- 23) Nakata S, Imai Y, Takanashi Y, Kurosawa H, Tezuka K, Nakazawa M, Ando M, Takao A. A new method for the quantitative standardization of cross-sectional areas of the pulmonary arteries in congenital heart diseases with decreased pulmonary blood flow. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1984;88:610-619.
- 24) Piehler JM; Danielson GK, McGoon DC, Wallace RB, Fulton RE, Mair DD. Management of pulmonary atresia with ventricular septal defect and hypoplastic arteries by right ventricular outflow construction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980;80:552–567.
- 25) Pacifico AD, Kirklin JW, Blackstone EH. Surgical management of pulmonary stenosis in tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1977;74:382-395.
- 26) Van den Berg J, Hop WC, Strengers JLM, de Jongste JC, van Osch-Gevers L, Meijboom EJ, Pattynama PMT, Bogers AJJC, Helbing WA. Clinical condition at mid-to-late follow-up after transatrial-transpulmonary repair of tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133:470-477.
- 27) Carvalho JS, Shinebourne EA, Busst C, Redington AN. Exercise capacity after complete repair of tetralogy of Fallot: deleterious effects of residual pulmonary regurgitation. *Br Heart J* 1992;67:470-473.

- 28) de Ruijter FTH, Weenink I, Hitchcock FJ, Meijboom EJ, Bennink GBWE. Right ventricular dysfunction and pulmonary valve replacement after correction of tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1794-1800.
- 29) Davlouros PA, Karatza AA, Gatzoulis MA, Shore DF. Timing and type of surgery for severe pulmonary regurgitation after repair of tetralogy of Fallot. *Int J Cardiol* 2004;97:91-101.
- 30) d'Udekem d'Acoz Y, Pasquet A, Lebreux L, Ovaert C, mascart F, Robert A, Rubay JE. Does right ventricular outflow tract damage play a role in the genesis of late right ventricular dilatation after tetralogy of Fallot repair? *Ann Thorac Surg* 2003;76:555-561.
- 31) Gatzoulis MA, Clark AL, Cullen S, Newman CGH, Redington AN. Right ventricular diastolic function 15 to 35 years after repair of tetralogy of Fallot: restrictive physiology predicts superior exercise performance. *Circulation* 1995;91:1775-1781.
- 32) Davlouros PA, Kilner PJ, Hornung TS, Li W, Francis JM, Moon JC, Smith GC. Right ventricular function in adults with repaired tetralogy of Fallot assessed with cardiovascular magnetic resonance imaging: detrimental role of right ventricular outflow aneurysms or akinesia and adverse right to left interaction. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:2044-2052.
- 33) Laneve SA, Uesu CT, Taguchi JT. Isolated pulmonary valvular regurgitation. *Am J Med Sci* 1962;244:446-458.
- 34) Gatzoulis MA, Till JA, Somerville J, Redington AN. Mechanoelectrical interaction in tetralogy of Fallot. QRS prolongation relates to right ventricular size and predicts malignant ventricular arrhythmias and sudden death. *Circulation* 1995;92:231-237.
- 35) Abd El Rahman MY, Abdul-Khaliq H, Vogel M, Alexi-Meskischvili V, Gutberlet M, Lange PE. Relation between right ventricular enlargement, QRS duration, and right ventricular function in patients with tetralogy of Fallot and pulmonary regurgitation after surgical repair. *Heart* 2000;84:416-420.

- 36) Liang XC, Cheung EW, Wong SJ, Cheung YF. Impact of right ventricular volume overload on three-dimensional global left ventricular mechanical dyssynchrony after surgical repair of tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol* 2008;102:1731-1736.
- 37) Schauenstein K, Dohr G, Preisegger KH. Stammzellen aus dem Nabelschnurblut. *J Fertil Reprod* 2003;13:9-13.
- 38) Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11917-11923.
- 39) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:658-659.
- 40) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, Mc Kay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-705.
- 41) Fukuda K, Yuasa S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res* 2006;98:1002-1013.
- 42) Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 1998;83:1-14.
- 43) Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002;346:5-15.
- 44) Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. Bone-marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 2003;107:1247-1249.
- 45) Bonanno G, Mariotti A, Procoli A, Corallo M, Rutella S, Pessina G, Scambia G, Mancuso S, Pierelli L. Human cord blood CD133+ cells immunoselected by a clinical-grade apparatus differentiate in vitro into endothelial- and cardiomyocyte-like cells. *Transfusion* 2007;47:280-289.

- 46) Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:893-908.
- 47) Leor J, Guetta E, Feinberg MS, Galski H, Bar I, Holbova R, Miller L, Zarin P, Castel D, Barbash IM, Nagler A. Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells* 2006;24:772-780.
- 48) Wairiuko GM, Crisostomo PR, Wang M, Morrell ED, Meldrum KK, Lillemoe KD, Meldrum DR. Stem cells improve right ventricular functional recovery after acute pressure overload and ischemia reperfusion injury. *J Surg Res* 2007;141:241-246.
- 49) Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schümichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *The Lancet* 2003;361:45-46.
- 50) Yerebakan C, Kaminski A, Liebold A, Steinhoff G. Safety of intramyocardial stem cell therapy for the ischemic myocardium: results of the Rostock trial after 5-year follow-up. *Cell Transplant* 2007;16:935-940
- 51) Harris DT, Rogers I. Umbilical cord blood: A unique source of pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2007;2:301-309.
- 52) Cheng-heng HU, Gui-fu WU, Xiao-qing W, Yan-hua Y, Zhi-min DU, Xiao-Hong HE, Peng X. Transplanted human umbilical cord blood mononuclear cells improve left ventricular function through angiogenesis in myocardial infarction. *Chin Med J* 2006;119:1499-1506.
- 53) Hirata Y, Sata M, Motomura N, Takanashi S, Suematsu Y, Ono M, Takamoto S. Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:609-614.
- 54) Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici Ö, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Ameida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200:123-135.

- 55) Watt SM, Contreras M. Stem cell medicine umbilical cord blood and its stem cell potential. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005;10:209-220.
- 56) Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;24:1294-1301.
- 57) Ma N, Stamm C, Kaminski A, Li W, Kleine HD, Müller-Hilke B, Zhang L, Ladilov Y, Egger D, Steinhoff G. Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/SCID-mice. *Cardiovasc Res* 2005;66:45-54.
- 58) Dhot PS, Nair V, Swarup D, Sirohi D, Ganguli P. Cord blood stem cell banking and transplantation. *Indian J Pediatr* 2003;70:989-992.
- 59) Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004;22:625-634.
- 60) Reinisch A, Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Bjelic-Radisic V, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Regen Med* 2007;2:371-382.
- 61) Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology* 2000;109:235-242.
- 62) Fuchs JR, Hannouche D, Terada S, Zand S, Vacanti JP, Fauza DO. Cartilage engineering from ovine umbilical cord blood mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* 2005;23:958-964.
- 63) van de Ven C, Collins D, Bradley MB, Morris E, Cairo MS. The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration. *Exp Hematol* 2007;35:1753-1765.
- 64) Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-1178.

- 65) Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:526-532.
- 66) Bojanić I, Golubić Cepulić B. Umbilical cord blood as a source of stem cells. *Acta Med Croatica* 2006;60:215-225.
- 67) Mazurier F, Doedens M, Gan OI, Dick JE. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med* 2003;9:959-963.
- 68) Fan CL, Li Y, Gao PJ, Liu JJ, Zhang XJ, Zhu DL. Differentiation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood CD34+ cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:212-218.
- 69) Ma N, Ladilov Y, Kaminski A, Piechaczek C, Choi YH, Li W, Steinhoff G, Stamm C. Umbilical cord blood cell transplantation for myocardial regeneration. *Transplant Proc* 2006;38:771-773.
- 70) Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* 2007;25:2017-2024.
- 71) Cord blood stem cells and cardiovascular disease:  
<http://www.medicalnewstoday.com/articles/97995.php>
- 72) Yerebakan C, Sandica E, Prietz S, Klopsch C, Ugurlucan M, Kaminski A, Abdija S, Lorenzen B, Boltze J, Nitzsche B, Egger D, Barten M, Furlani D, Ma N, Vollmar B, Liebold A, Steinhoff G. Autologous umbilical cord blood mononuclear cell transplantation preserves right ventricular function in a novel model of chronic right ventricular volume overload. *Cell Transplant* 2009 Apr 9. pii: CT-2015. [Epub ahead of print].
- 73) Naruse K, Fujieda M, Miyazaki E, Hayashi Y, Kuroda N, Nakayama H, Kiyoku H, Hiroi M, Kurashige T, Enzan H. CD34 expression as a novel marker of transformed mesangial cells in biopsied glomerular diseases. *J Pathology* 1999;189:105-111.

- 74) Beauchamp JR, Heslop L, Yu DSW, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 2000;151:1221-1233.
- 75) Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low-density-lipoprotein. *J Cell Biol* 1984;99:2034-2040.
- 76) Molecular Probes™. Product Information. Revised: 18-July-2006. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp03482.pdf>
- 77) Borenstein N, Jian Z, Fromont G, Bruneval P, Hekmati M, Behr L, Laborde F, Montarras D, Le Bret E. Noncultured cell transplantation in an ovine model of right ventricular preparation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:1119-1127.
- 78) Gust R, Gottschalk A, Bauer H, Bottiger BW, Bohrer H, Martin E. Cardiac output measurement by transpulmonary versus conventional thermodilution technique in intensive care patients after coronary artery bypass grafting. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1998;12:519-522.
- 79) Yerebakan C, Klopsch C, Prietz S, Boltze J, Vollmar B, Liebold A, Steinhoff G, Sandica E. Pressure-volume loops: feasible for the evaluation of right ventricular function in an experimental model of acute pulmonary regurgitation? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2009;9:163-168.
- 80) Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 1984;70:812-823.
- 81) Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissue. *J Histochem Cytochem* 2006;54:385-395.
- 82) Davos CH, Davlourus PA, Wensel R, Francis D, Davies LC, Kilner PJ, Coats AJS, Piepoli M, Gatzoulis MA. Global impairment of cardiac autonomic nervous activity late after repair of tetralogy of Fallot. *Circulation* 2002;106:169-175.

- 83) Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-3017.
- 84) Ammash NM, Dearani JA, Burkhart HM, Connolly HM. Pulmonary regurgitation after tetralogy of Fallot repair: clinical features, sequelae, and timing of pulmonary valve replacement. *Congenit Heart Dis* 2007;2:386-403.
- 85) Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, Wu J, Angoulvant D, Wnendt S, Muhs A, Spitzkovsky D, Li RK. Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation* 2005;112:96-104.
- 86) Carrel A. Experimental operations on the orifices of the heart. *Ann Surg* 1914;60:1-6.
- 87) Alvarez BV, Pérez NG, Ennis IL, Camiliòn de Hurtado MC, Cingolani HE. Mechanisms underlying the increase in force and Ca(2+) transient that follow stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect. *Circ Res* 1999;85:716-722.
- 88) Brixius K, Reuter H, Bloch W, Schwinger R. Altered hetero- and homeometric autoregulation in the terminally failing human heart. *Eur J Heart Fail* 2005;7:29-35.
- 89) Roncon-Albuquerque R Jr, Vasconcelos M, Lourenço AP, Brandão-Nogueira A, Teles A, Henriques-Coelho T, Leite-Moreira AF. Acute changes of biventricular gene expression in volume and right ventricular pressure overload. *Life Sci* 2006;78:2633-2642.
- 90) Ishibashi Y, Rembert JC, Carabello BA, Nemoto S, Hamawaki M, Zile MR, Greenfield JC, Cooper G. Normal myocardial function in severe right ventricular volume overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:11-16.
- 91) Szabo G, Soos P, Bährle S, Radovits T, Weigang E, Kekesi V, Merkely B, Hagl S. Adaption of the right ventricle to an increased afterload in the chronically volume overloaded heart. *Ann Thorac Surg* 2006;82:989-995.

- 92) Pasipoularides AD, Shu M, Shah A, Silvestry Scott, Glower DD. Right ventricular diastolic function in canine models of pressure overload, volume overload, and ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:2140-2150.
- 93) Sibbald WJ, Driedger AA. Right ventricular function in acute disease states: pathophysiological consideration. *Crit Care med* 1983;11:339-345.
- 94) Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH, Armstrong PW. Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation* 1990;82:1387-1401.
- 95) Ruzicka M, Keeley FW, Leenen FHH. The renin-angiotensin system and volume overload-induced changes in cardiac collagen and elastin. *Circulation* 1994;90:1989-1996.
- 96) Agata J, Chao L, Chao J. Kallikrein gene delivery improves cardiac reserve and attenuates remodeling after myocardial infarction. *Hypertension* 2002;40:653-659.
- 97) Jones M, Ferrans VJ. Myocardial degeneration in congenital heart disease: comparison of morphologic findings in young and old patients with congenital heart disease associated with muscular obstruction to right ventricular outflow. *Am J Cardiol* 1977;39:1051-1063.
- 98) Garson A. Ventricular arrhythmias after congenital heart surgery: a canine model. *Pediatr Res* 1984;18:1112-1120.
- 99) Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis, Wilensky RL. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27:1114-1122.
- 100) Dohmann HFR, Perin EC, Takiya CM, Silva GV, Sousa ALS, Mesquita CT, Rossi MID, Pascarelli BMO, Assis IM, Dutra HS, Assad JAR, Castello-Branco RV, Drummond C, Dohman HJF, Willerson JT, Borojevic R. Transendocardial autologous bone marrow mononuclear cell injection in ischemic heart failure: postmortem anatomicopathologic and immunohistochemical findings. *Circulation* 2005;112:521-526.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |
|-------------------|---|
| %                 | Prozent (x von 100)   |
| °C                | Grad Celsius  |
| A                 | Alpha; 1. Buchstabe des griechischen Alphabets  |
| β                 | Beta, 2. Buchstabe des griechischen Alphabets   |
| Γ                 | Gamma; Buchstabe des griechischen Alphabets   |
| A                 | Aorta   |
| A.                | Arteria   |
| Abb.              | Abbildung   |
| AcLDL             | Acetyliertes Low-Density-Lipoprotein  |
| ALAT              | Alanin-Amino-Transferase  |
| AP                | Alkalische Phosphatase  |
| ASAT              | Aspartat-Amino-Transferase  |
| ASD               | Atriumseptumdefekt  |
| BSA               | Rinderserum-Albumin (Bovine Serum Albumin)  |
| bspw.             | Beispielsweise  |
| bzw.              | Beziehungsweise   |
| CD                | Zelloberflächenantigen (Cluster of Differentiation)   |
| CK                | Kreatinkinase   |
| Cm                | Zentimeter = $10^{-2}$ m  |
| cm <sup>2</sup>   | Quadratcentimeter = $10^{-2}$ m x $10^{-2}$ m   |
| CT                | Computertomographie   |
| d.h.              | das heißt   |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid  |
| dp/dt max         | maximale Geschwindigkeit des Druckanstiegs  |
| dp/dt min         | maximale Geschwindigkeit des Druckabfalls   |
| Eed               | Anstieg der EDPVR-Funktion - Maß für die Wandspannung   |
| Ees               | Anstieg der ESPVR-Funktion – Maß für die Elastance  |
| EDP               | enddiastolischer Druck  |
| EDTA              | Ethylendiamin-tetraacetat   |
| EDPVR             | Enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung   |
| EDV               | enddiastolisches Volumen  |
| EF                | Ejektionsfraktion   |
| EKG               | Elektrokardiogramm  |
| ESP               | endsystolischer Druckpunkt  |
| ESPVR             | Endsystolische-Druck-Volumen-Beziehung  |
| ESV               | endsystolisches Volumen   |
| EtCO <sub>2</sub> | endtidales Kohlendioxid   |
| F                 | French  |
| FACS              | Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting)                                      |
| FDA               | Amerikanische Zulassungsbehörde für Lebensmittel und Medikamente (Food and Drug Administration) |
| FITC              | Fluoresceinisothiocyanat, Anregungsmaximum 495nm  |

---

|               |   |
|---------------|---|
| G             | Gramm oder Erdbeschleunigung ( $=9,81 \text{ m/s}^2$ )  |
| G             | Gauge   |
| $\gamma$ -GT  | Gamma-Glutaryltransferase   |
| GvHR          | Transplantat-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Reaktion)   |
| Hb            | Hämoglobin  |
| H.E.          | Hematoxilin-Eosin   |
| HF            | Herzfrequenz  |
| HGF           | Hepatozytenwachstumsfaktor (hepatocyte growth factor)   |
| Hk            | Hämatokrit  |
| HSC           | Hämatopoetische Stammzelle  |
| HZV           | Herzzeitvolumen   |
| ICR           | Interkostalraum   |
| IMDM          | Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium   |
| i.v.          | Intravenous   |
| K             | Kalium  |
| Kg            | 1 Kilogramm = $10^3$ Gramm  |
| KGW           | Körpergewicht   |
| LA            | Linkes Atrium   |
| Lac           | Laktat  |
| LDH           | Laktatdehydrogenase   |
| LDL           | Lipoprotein niedriger Dichte (Low-Density-Lipoprotein)  |
| Leu           | Leukozyten  |
| LV            | linker Ventrikel  |
| LVEF          | linksventrikuläre Ejektionsfraktion   |
| M             | Molmasse = g/ mol   |
| MCV           | Mittleres korpuskuläres Volumen (Mean Corpuscular Volume)   |
| Mg            | Milligramm = $10^{-3}$ g  |
| Min           | 1 Minute = 60 Sekunden  |
| $\text{mm}^2$ | Quadratmillimeter = $10^{-3} \text{ m} \times 10^{-3} \text{ m}$  |
| mmHg          | Millimeter-Quecksilbersäule = Torr = 133.322 Pa   |
| ml            | Milliliter = $10^{-3}$ l  |
| MNC           | Mononukleäre Zellen   |
| MRT           | Magnetresonanztomographie   |
| MSC           | mesenchymale Stammzellen  |
| mU            | Millieinheit (Milliunit)  |
| MYCH          | schwere Myosinkette (Myosin heavy chain)  |
| N             | Anzahl  |
| Na            | Natrium   |
| NaCl          | Natriumchlorid  |
| NOD/SCID      | Nicht-fettleibiger Diabetes/ schwere kombinierte Immundefizienz (non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency) |
| NSB           | Nabelschnurblut   |
| P20           | Volumen bei definierten Druck von 20 mmHg   |
| P40           | Volumen bei definierten Druck von 40 mmHg   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| PA              | Pulmonalarterie  |
| PAK             | Pulmonalarterienkatheter   |
| PBS             | Phosphat-gepufferte-Salzlösung   |
| PDA             | Persistierender Ductus arteriosus Botalli                                      |
| PFA             | Paraformaldehyd  |
| PI              | Pulmonalklappeninsuffizienz  |
| PK              | Pulmonalklappe   |
| $P_{\max}$      | maximaler Druck  |
| PRSW            | Vorlastabhängige Schlagvolumenarbeit   |
| PS              | Pulmonalklappenstenose   |
| PTT             | Partielle Thromboplastinzeit   |
| PV-Loop         | Druck-Volumen-Kurve  |
| RA              | rechtes Atrium   |
| $\rho$ -Wert    | Rho: spezifischer Widerstand   |
| RT              | Raumtemperatur   |
| RV              | rechter Ventrikel  |
| RVEDV           | rechtsventrikuläres enddiastolisches Volumen                                   |
| RVEF            | rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion   |
| RVESV           | rechtsventrikuläres endsystolisches Volumen                                    |
| RVOT            | rechtsventrikulärer Ausflusstrakt  |
| SCF             | Stammzellfaktor (stem cell factor)   |
| SDF-1           | stromal cell-derived factor  |
| SF              | subepikardiales Fett   |
| SSC             | 90° Streulicht einer Zelle nach Anregung, Maß für Granularität (Side Scatter); |
| SV              | Schlagvolumen  |
| TAP             | transanuläre Erweiterungsplastik   |
| Thro            | Thrombozyten   |
| TI              | Trikuspidalklappeninsuffizienz   |
| TNF             | Tumornekrosefaktor   |
| TOF             | Fallot'sche Tetralogie (Tetralogy of Fallot)                                   |
| U               | Einheit (Unit)   |
| $\mu\text{l}$   | Mikroliter = $10^{-6}$ l   |
| $\mu\text{g}$   | Mikrogramm = $10^{-6}$ g   |
| $\mu\text{m}$   | Mikrometer = $10^{-6}$ m   |
| $\mu\text{m}^2$ | Quadratmikrometer = $10^{-6}$ m x $10^{-6}$ m                                  |
| USSC            | Unrestringierte somatische Stammzellen (Unrestricted Somatic Stem Cells)       |
| V.              | Vena   |
| Vv.             | Venae  |
| V0              | Volumen bei einem ESP-Wert von 0 mmHg  |
| V20             | Druckwert bei einem definierten Volumen von 20 ml                              |
| V40             | Druckwert bei einem definierten Volumen von 40 ml                              |
| v.a.            | vor allem  |
| VEGF            | Endothelzell-Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)              |
| VSD             | Ventrikelseptumdefekt  |

|      |                      |
|------|----------------------|
| z.B. | zum Beispiel         |
| ZVK  | Zentralvenenkatheter |

## Curriculum vitae

Familienname: Nemati, geb. Prietz  
Vorname: Stephanie  
Geburtsdatum: 04. November 1982  
Geburtsort: Frankfurt an der Oder  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: verheiratet  
Eltern: Henry Prietz und Heike Prietz, geb. Buchholz

Schule:  
1989-2002 Frankfurt an der Oder  
Juni 2002 Abitur am Otto-Brenner-Gymnasium in Frankfurt an der Oder

Studium:  
seit 2003 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock  
September 2005 Ärztliche Vorprüfung  
Juni 2010 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Famulaturen:  
Kardiologie, Klinik für Innere Medizin, Universität Rostock  
Nephrologische Gemeinschaftspraxis, Südstadt, Rostock  
Allgemeinarztpraxis, Südstadt, Rostock  
Pädiatrie, Klinik für Kinder und Jugendliche, Universität Rostock  
Klinik für Herzchirurgie, Universität Rostock  
Psychatrie, Rhön-Klinikum, Frankfurt an der Oder

Praktisches Jahr:  
1.Tertial: Unfallchirurgie und Gefäßchirurgie, Chirurgische  
Universitätsklinik, Universität Rostock  
2.Tertial: Nephrologie und Infektiologie, Klinik für Innere Medizin,  
Universität Rostock  
3.Tertial: Klinik für Herzchirurgie, Universität Rostock

Nebentätigkeiten: Studentische Hilfskraft an der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie im  
Rahmen von Großtierversuchen



Yerebakan C, Ugurlucan M, **Prietz S**, Klopsch C, Boltze J, Liebold A, Steinhoff G. Autologous umbilical cord mononuclear cell transplantation preserves right ventricular function in a novel model of right ventricular volume overload. 10<sup>th</sup> National Congress of the Turkish Society for Cardiovascular Surgery. 17.-21. Oktober 2008, Izmir, Turkey.

Yerebakan C, Klopsch C, **Prietz S**, Niefeldt S, Kaminski A, Boltze J, Vollmar B, Ma N, Sandica E, Liebold A, Steinhoff G. Acute and chronic response of the right ventricle to surgically induced volume and pressure overload – Analysis using conductance catheter method. 19<sup>th</sup> Annual meeting of the Scandinavian Society of research in Cardiothoracic Surgery (SSRCTS). 5.-7. Februar 2009, Geilo, Norwegen

Yerebakan C, Klopsch C, **Prietz S**, Kaminski A, Boltze J, Liebold A, Steinhoff G, Sandica E. Pressure-volume loops: Feasible for the evaluation of right ventricular function in an experimental setting of acute pulmonary regurgitation. Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, 15.-18. Februar 2009, Stuttgart, Deutschland

Yerebakan C, Sandica E, **Prietz S**, Klopsch C, Kaminski A, Ugurlucan M, Boltze J, Liebold A, Steinhoff G. Right ventricular function profits from intramyocardial transplantation of autologous umbilical cord mononuclear cells in a novel model of chronic volume overload in sheep. Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, 15.-18. Februar 2009, Stuttgart, Deutschland

## Poster

Klopsch C, Yerebakan C, Sandica E, **Prietz S**, Kaminski A, Ugurlucan M, Steinhoff G. A novel experimental model on chronic right ventricular volume overload. 18th Annual Meeting of the Scandinavian Society of research in Cardiothoracic Surgery (SSRCTS). 7.-9. Februar 2008, Geilo, Norwegen

Yerebakan C, Sandica E, **Prietz S**, Klopsch C, Ugurlucan M, Kaminski A, Liebold A, Steinhoff G. Autologous implantation of umbilical cord mononuclear cells preserves right ventricular function in a novel model of right ventricular volume overload. Scientific Sessions 2008, American Heart Association, 8.-12. November 2008, New Orleans, Louisiana, USA

## Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff danke ich herzlichst für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Vermittlung der Zusammenarbeit mit Dr. med. Can Yerebakan. Mein besonderer Dank gehört Dr. med. Can Yerebakan, der dieses Projekt mit unbändigem Ehrgeiz und viel Mühe geleitet hat und mir sowohl während des Projektes als auch in der Bearbeitungsphase immer wieder mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich bin glücklich, dass ich die Möglichkeit hatte an diesem Projekt zu arbeiten.

Ich bedanke mich bei Christian Klopsch für die Energie mit der auch er an diesem Projekt gearbeitet hat.

Frau Margit Fritsche und Herrn Reinhardt Schwärmer bin ich dankbar für ihre große Hilfe und den Bemühungen auch das Unmögliche zu ermöglichen. Ohne die tolle Zusammenarbeit hätten die Versuche nicht so reibungslos funktioniert.

Den Mitgliedern des Tierarztteams, Dr. med. Johannes Boltze und Björn Nitzsche danke ich für die wertvollen Ratschläge und den erquicklichen Einsatz während der Versuche.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. med. habil. Malte Barten, der mir in der Beurteilung der Histologie zur Seite stand und der mir die Zusammenarbeit mit seinem Labor ermöglichte.

Ich danke Frau Westphal und ihrem Team für die unendliche Mühe in diesem Projekt.

Frau Katharina Gottschall und die Mitarbeiter aus der Abteilung der Klinischen Chemie haben sich netterweise für die Bearbeitung der Blutproben bereit erklärt. Vielen Dank dafür.

Ich danke Dr. med. Nan Ma und den Mitarbeitern im Labor für die gute Zusammenarbeit.

Einen lieben Dank auch an Kristin Teucher und Dr. Oda Buchholz für die Mithilfe in diesem Projekt.

Ich bedanke mich auch bei Dr. Sefer Abdija, Frau Heike Opitz von Vita 34, den Tierpflegern in Dummerstorf und Dr. med. Björn Lorenzen sowie Frau Dipl. Math. Helga Krentz für die Unterstützung in diesem Projekt.

Ich danke meinem Mann Navid für die liebevolle Unterstützung, für die unendliche Geduld und das Verständnis, das er in dieser Zeit für mich aufgebracht hat.

Ich danke meinen Eltern und meinen Brüdern für die Unterstützung während des Studiums und dass sie mich zu dem Menschen gemacht haben der ich heute bin.

---

## Thesen

- 1) Das Ziel der Studie war die Beurteilung der Effektivität der intramyokardialen Applikation autologer mononukleärer Zellen des Nabelschnurblutes bei chronischer Volumenbelastung des rechten Ventrikels. Ein weiterer Aspekt war die Entwicklung einer neuen experimentellen Methode zur chirurgischen Induktion einer rechtsventrikulären Volumenbelastung im Schafmodell mit klinischer Relevanz bei korrigierter Fallot'scher Tetralogie.
- 2) Bei der Korrektur der Fallot'schen Tetralogie, dem häufigsten angeborenen primärzyanotischen Herzfehler, sind in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt worden, wengleich die Langzeitergebnisse durch die Ausbildung einer rechtsventrikulären Volumenbelastung noch limitiert sind.
- 3) Die Stammzellen aus dem Nabelschnurblut können unter der Geburt einfach, komplikationslos und schmerzfrei entnommen werden. Die Entnahme des Nabelschnurblutes gilt als ethisch unbedenklich. Aus dem Nabelschnurblut können die mononukleären Zellen erfolgreich mit der Pancoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden. Die in-vitro-Analyse der Zellen ergab  $1,2 \pm 0,22\%$  CD34-positive Zellen innerhalb der isolierten mononukleären Zellfraktion des Endprodukts. CD34 ist ein bekannter Marker für hämatopoetische Stammzellen, Satellitenzellen und endotheliale Progenitorzellen. Das Vorkommen endothelialer Progenitorzellen im Nabelschnurblut konnte durch die in-vitro-Kultivierung mit speziellem Medium bestätigt werden. In der Kultur konnten AcLDL positiv gefärbte Endothelzellen nachgewiesen werden.
- 4) Das experimentelle Modell zur chirurgischen Induktion einer Pulmonalklappeninsuffizienz durch die Infundibulotomie des rechten Ventrikels und die Implantation einer transanulären Erweiterungsplastik auf den rechtsventrikulären Ausflusstrakt ist zur Darstellung der chronischen rechtsventrikulären Volumenbelastung geeignet. Unter den Versuchstieren verursachte der chirurgische Eingriff keine Mortalität. Der chirurgische Eingriff ermöglichte das Setzen einer standardisierten Pulmonalklappeninsuffizienz bei allen Tieren, welche durch die Konduktanz-Katheter-Messungen intraoperativ und durch die Echokardiographie postoperativ bestätigt wurde.
- 5) In den Konduktanz-Katheter-Messungen nach 3 Monaten konnten in der Zellgruppe ein Anstieg des Kontraktilitätsmarkers  $dp/dt_{\max}$  und der Indices für die Elastizität, der  $dp/dt_{\min}$ -Wert und der Eed-Wert nachgewiesen werden. Diese Konstellation ist ein Ausdruck für die bessere Anpassung der Herzen an die Belastung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

- 6) Die Immunhistologie mit CD31 zeigte in der Zellgruppe eine signifikante Erhöhung der Kapillardichte in der Region der Zelltransplantation ( $p < 0.01$ ). Die erhöhte Kapillardichte kann eine verbesserte Perfusion des Myokards im transplantierten Areal vermuten lassen. Der Nachweis von Endothelzellen in der primären Kultur des Nabelschnurblutes lässt eine entscheidende Rolle dieser Zellen im Prozess der Angiogenese vermuten.
- 7) Es ist bereits bekannt, dass Stammzellen die Produktion proinflammatorischer Mediatoren im ischämischen Myokard reduzieren und einen protektiven Effekt ausüben. Eine ähnliche parakrine Wirkung der applizierten mononukleären Zellen auf das volumenbelastete Myokard ist zu vermuten. Ob die erhöhte Angiogenese ein direkter Effekt der Zelltransplantation ist oder auf die Beeinflussung residenter Stammzellen durch die applizierten Zellen zurückgeführt werden kann, bedarf noch der Klärung.
- 8) Nach den 3 Monaten zeigten weder die histologischen und makroskopischen Auswertungen noch die Befunde der Computertomographie einen nachteiligen Gewebeumbau im rechtsventrikulären Myokard durch die Stammzelltherapie. Die gewählte intramyokardiale Applikation der mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes erweist sich als sicher.
- 9) Auf dem Gebiet der myokardialen regenerativen Medizin ist die vorgelegte Arbeit, nach unserem Kenntnisstand, die erste Studie, die die intramyokardiale Transplantation autologer mononukleärer Zellen aus dem Nabelschnurblut, die Betrachtung des rechten Ventrikels und die Chirurgie angeborener Herzfehler kombiniert. Es konnte gezeigt werden, dass die experimentelle Methode zur chirurgischen Induktion einer Pulmonalklappeninsuffizienz, herbeigeführt durch die Infundibulotomie des rechten Ventrikels und die Implantation einer transanulären Erweiterungsplastik auf dem RVOT, ohne Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine ein geeignetes Modell für die akute und chronische rechtsventrikuläre Volumenbelastung darstellt. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die intramyokardiale Applikation autologer mononukleärer Zellen aus dem Nabelschnurblut in diesem Modell sicher und effektiv ist und zu einer Verbesserung der diastolischen Herzfunktion führt. Die Ergebnisse der in-vitro-Analyse der Zellen und der Nachweis von Endothelzellen in der primären Kultur lassen eine Induktion der Neoangiogenese durch die applizierten mononukleären Zellen vermuten.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzen Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 18. 09. 2009

Stephanie Nemati

## Obduktionsbericht

**Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit  
und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern**

- Tierseuchendiagnostik -



LALLF MV • Postfach 10 20 64 • 18003 Rostock

Vfg.

1.

Universität Rostock  
Medizinische Fakultät  
Abt. für Experimentelle Chirurgie  
Schillingallee 69a  
Postfach 10 08 88

18055 Rostock

u-schu

Dienstgebäude: Thierfelderstr. 18  
18059 Rostock  
Telefon: 0381/40 35-0  
Telefax: 0381/4 00 15 10  
Mail: Poststelle@lallf.mvnet.de

---

Bearbeitet von: Dr. Uhl  
Tel. Durchwahl: 219  
Aktenzeichen:  
Ort, Datum: Rostock, 06.07.2007

**Prüfbericht**

|   |  |
|---|--|
| PE-Nr.: 07 12000 RD 1689  | Eingangsdatum: 27.06.2007  |
| Kreis: HRO  | Untersuchungsbeginn: 27.06.2007  |
| Untersuchungsmaterial: 1 Tierkörper   | Tierart: Schaf   |
| Kennzeichen OM links: DE 0114 000/14638,<br>LKV Sachsen<br>2. OM links: 0310988<br>Rückenkennzeichnung: W 0310988 | Rasse:   |
| Gewicht: 33,5 kg  | Geschlecht: weiblich   |
| Alter: adult  | <input type="checkbox"/> gestorben <input checked="" type="checkbox"/> getötet <input type="checkbox"/> lebend |
| Einsender: siehe oben   | Vorbericht: mittelgrad. Pneumonie, Nasenausfluss, Konjunktivitis, Torticollis                                  |

Die pathologisch-anatomische Untersuchung und die Laboruntersuchungen ergaben:

- Ernährungszustand: gut,
- verstärktes Längenwachstum der Klauenwandhorns innen beidseits und Abwinkelung zur Sohle hin (bis 1 cm),
- ausgedehntes Hämatom im Bereich der Drosselvene,
- in der Blase ca. 2 ml Harn,
- Rektuminhalt dickbreiig bis geformt,
- Nasenschleimhaut mittelgradig gerötet, in der Nasenhöhle schaumige wässrige Flüssigkeit,
- Schaum in der Trachea geringgradig, Schleimhaut geringgradig gerötet, in der unteren Trachea mittelgradig petechiale Blutungen,
- Lunge rechts schlecht kollabiert, gestaut, links mäßig bis gut kollabiert, gestaut,
- geringgradige Milzschwellung,
- in der Leber magenseitig einzelne subseröse Blutungen,
- Nieren o. b. B.,
- Euter ödematös; Zisternen prall gefüllt mit wässriger Flüssigkeit; Euterparenchym partiell rotbraun,

**Hauptsitz**  
Post: Postfach 10 20 64 18003 Rostock  
Haus: Thierfelderstr. 18 18059 Rostock  
Tel./Fax: 0381-4035-0 / 4001510

**AKS** Akkreditiertes Prüflaboratorium  
Register-Nr. AKS-F-11301-EU  
Staatliche Akkreditierungsstelle Hannover  
rd1689uhl.doc Seite 1/2

- Mägen mit Inhalt = 9,5 kg; starke Pansenweitung, prall gefüllt mit ca. 6 kg gut durchsaftetem Futter, Pansenschleimhaut in Ablösung; Netz- und Blättermagen o. b. B.; im Labmagen ca. ½ l gelbgrüne Flüssigkeit,
  - Dünndarm durchgängig geweitet, mittelgradig aufgegastr, Darmlymphknoten leicht geschwollen; Caecum geweitet, Ø 7 – 8 cm
- histol.: Gehirn (3x) – 3x o. b. B.  
 Leber – leichte Zelldissoziation, Blutstauung in Sinusoiden  
 Euter – Gefäße gestaut, fokale (Diapedesis-) Blutungen im Interstitium mittelgradig;  
 PAS-Färbung: o. b. B.  
 Lymphknoten – verwaschene Lymphfollikel, o. b. B.  
 Lunge 1 – regional stärkere Stauung mit kleineren, teils ödematösen, teils blutgefüllten Alveolen mittelgradig, dazwischen emphysematöse Alveolen, Proliferation von peribronchialen lymphatischem Gewebe geringgradig, vereinzelt kollabierte Bronchien  
 Lunge 2 – ödematöse und blutgefüllte Alveolen gering- bis mittelgradig, lobulär ausgeprägt (ähnlich 1)
- bakt.: innere Organe einschließlich Milchdrüsengewebe – unspezifischer Keimgehalt (mittelgradiger Keimgehalt)  
 Untersuchung auf Listerien – negativ  
 anaerob (Darm): mittelgradig Clostridium perfringens im Jejunum
- paras. Darm: Flotation – mittelgradig Kokzidienoozysten  
 Abstrich/Auswanderverfahren – negativ  
 Labmagen stereomikroskop.: negativ
- klin.-chemisch Pansensaft: pH = 5,2  
 Nitrat = negativ  
 Nitrit = negativ  
 Lactat = 84,2 mmol/l ↑↑  
 Gesamtazidität = 130 mmol/l ↑

**Diagnose:** Die Befunde sprechen für akute Pansenazidose, einhergehend mit Pansenüberladung/Pansenatonie.

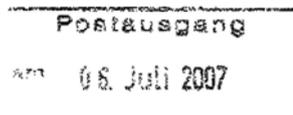
Den nachgewiesenen Clostridien sowie den Kokzidien wird eine untergeordnete Bedeutung beigemessen.

Pneumonische Veränderungen konnten nicht nachgewiesen werden (kann bei Pansenazidose vorgetäuscht werden), lediglich leichte Peribronchitis.

Untersuchungen der Leber auf Kupfer und Selen dauern an.

im Auftrag

Dr. Uhl  
 Tierarzt



Anlage:  
 Resistenzteste (1 Seite)

2. z. d. A.

Die Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Prüfgegenstände. Ohne schriftliche Genehmigung darf dieser Bericht nicht auszugsweise vervielfältigt werden.

**Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern**

18059 Rostock, Thierfelderstrasse 18, Tel.: (0381) 4035-0, Fax: (0381) 4001510  
 17033 Neubrandenburg, Demminer Strasse 46-48, Tel.: (0395) 4550103, Fax: (0395) 4550199

Institut f. Experim.Chirurgie  
 Mediz. Fakultät, Uni Rostock  
 Schillingallee 69 a  
 18057 Rostock (Hansa-Viertel)

Kunden-Nr.: 116103  
 Institut f. Experim.Chirurgie  
 Mediz. Fakultät, Uni Rostock  
 Schillingallee 69 a  
 18057 Rostock (Hansa-Viertel)

**- Resistenztestergebnisse -**

Die Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Prüfgegenstände! Ohne schriftliche Genehmigung darf dieser Bericht nicht auszugeweiht vervielfältigt werden!

Eingangs-Nr.: **07 12000-RD 1689** vom 27.06.2007  
 Tierart: **Schaf**  
 Material: **Tierkörper**

**Probeneingang gesamt**

Erreger / Keimart:

**Clostridium perfringens**

| geprüfte Wirkstoffe |   | geprüfte Wirkstoffe |   | geprüfte Wirkstoffe |   | geprüfte Wirkstoffe |   |
|---------------------|---|---------------------|---|---------------------|---|---------------------|---|
| AMC                 | S | Ampicillin          | S | Apramycin           | R | Cefalotin           | S |
| Cefquinom           | S | Ceftiofur           | S | Clindamycin         | S | Enrofloxacin        | S |
| Erythromycin        | I | Florfenicol         | S | Gentamycin          | R | Neomycin            | R |
| Penicillin          | S | Spectinomycin       | R | SXT                 | R | SXT                 | R |
|                     |   |                     |   |                     |   | Haminfektion        |   |
| Tetracyclin         | S | Tiamulin            | S | Tilmicosin          | S |                     |   |

Legende: S- sensibel; I-intermediär; R-resistent; N-nicht geprüft;

SXT-Sulfamethoxazol/Trimethoprim; AMC-Amoxyicillin/Clavulansäure

Methode: Agardiffusionstest Bouillon-Mikrodilutionstest 

Dieser Befund wurde maschinell erstellt und ist ohne Unterschrift gültig.