

Aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Artur Lichtenberg

**Akzelerierte autologe *in vivo*-Rezellularisierung dezellularisierter
Aortenkonduits durch Oberflächenbeschichtung mit Fibronektin**

Dissertation

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

vorgelegt von
Christofer Delfs
2016

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Schipper

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Biomaterials (2013): **Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating** (A. Assmann, C. Delfs, H. Munakata, F. Schiffer, K. Horstkotter, K. Huynh, M. Barth, V.R. Stoldt, H. Kamiya, U. Boeken, A. Lichtenberg, P. Akhyari; 34(25): 6015-6026.)

Journal of Surgical Research (2012): **Development of a growing rat model for the in vivo assessment of engineered aortic conduits** (A. Assmann, P. Akhyari, C. Delfs, U. Flogel, C. Jacoby, H. Kamiya, and A. Lichtenberg; v. 176, no. 2, p. 367-375.)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 HERZ-KREISLAUF-ERKRANKUNGEN IN DER GESELLSCHAFT	1
1.2 ÄTIOLOGIE UND KLINIK DER AORTENKLAPPENDEFEKTE	2
1.3 THERAPIEOPTIONEN DER KLAPPENVITIIEN	3
1.4 HERZKLAPPENIMPLANTATE	4
1.4.1 Die mechanische Herzklappenprothese	4
1.4.2 Die biologische Herzklappenprothese	5
1.5 TISSUE ENGINEERING	7
1.6 KLINISCHER NUTZEN DES TISSUE ENGINEERING	9
1.7 FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT	10
2. MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1 MATERIAL.....	12
2.1.1 Chemikalien.....	12
2.1.2 Antikörper.....	14
2.1.3 Primersequenzen	15
2.1.4 Geräte & Verbrauchsmaterialien	16
2.1.5 Gebrauchslösungen	17
2.2 METHODEN.....	19
2.2.1 Einteilung der Versuchsgruppen	19
2.2.2 Explantation zur Konduitgewinnung	19
2.2.3 Dezellularisierung der Gefäßkonduits	20
2.2.4 Beschichtung mit Alexa488-konjugiertem Fibronectin	21
2.2.5 Präoperative Kontrolle der Beschichtung	21
2.2.6 Infrarenale Reimplantation der Gefäßkonduits	22
2.2.7 Funktionelle Evaluation der implantierten Konduits.....	23
2.2.8 Abschließende Explantation der Gefäßkonduits.....	24
2.2.9 Histologie.....	24
2.2.10 Quantitative Auswertung	30
2.2.11 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion	34
2.2.12 Statistik.....	35
3. ERGEBNISSE.....	36
3.1 OPERATIVES OUTCOME.....	36
3.2 BEWERTUNG DER DEZELLULARISIERUNG	37
3.3 PERSISTENZ DER FIBRONEKTIN-BESCHICHTUNG	38
3.4 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG.....	40
3.4.1 Qualitative und quantitative Auswertung der Neointima	40
3.5.3 Repopularisierung der Tunica media.....	50
3.5 ERGEBNISSE DER PCR	55

4. DISKUSSION	56
4.1 PERSISTENZ DER FIBRONEKTIN-BESCHICHTUNG	56
4.2 FIBRONEKTIN ZUR LUMINALEN OBERFLÄCHENMODIFIKATION.....	56
4.3 FIBRONEKTIN ZUR ADVENTITIELLEN OBERFLÄCHENMODIFIKATION	62
4.4 BEGRENZUNGEN DIESER ARBEIT	65
5. ZUSAMMENFASSUNG	66
6. EIGENE PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE	67
6.1 KONGRESSBEITRÄGE	67
6.2 VERÖFFENTLICHUNG IN FACHZEITSCHRIFTEN.....	67
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	68
8. LITERATURVERZEICHNIS	69
9. DANKSAGUNG	76

1. Einleitung

1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen in der Gesellschaft

Schon seit einem halben Jahrhundert stellen Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die Haupttodesursache in den industrialisierten Ländern dar. Trotz eines leichten Rückgangs von 0,7 Prozent waren 2011 in Deutschland laut statistischem Bundesamt insgesamt 40,2 Prozent der registrierten Todesfälle auf Erkrankungen des Herzkreislaufsystems zurückzuführen (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2011).

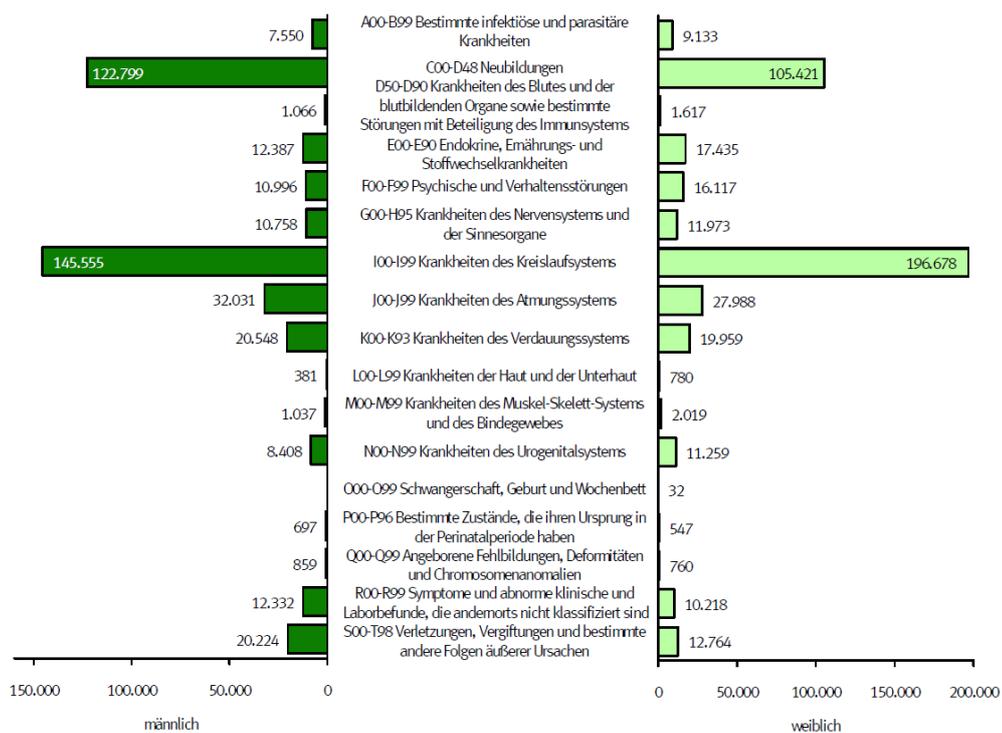


Abbildung 1 - Todesursachen nach ICD-10 Kapiteln. Für sowohl Männer als auch Frauen stellen Krankheiten des Kreislaufsystems die häufigste Todesursache dar. (Quelle: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2011)

Aufgrund einer immer älter werdenden Bevölkerung steigt dabei vor allem die Inzidenz der degenerativen Herzvitien (Kaltenbach, 2006). Da die Implantation einer neuen Herzklappe in vielen Fällen die einzige kausale Therapie der Herzvitien darstellt, ist die Optimierung dieser Eingriffe von großer Bedeutung.

Die Anzahl der Eingriffe zwecks isolierter Rekonstruktion oder Ersatz einer defekten Herzklappe hat dabei im Jahr 2011 um 4,0 Prozent auf 29 672 Fälle zugenommen und stellt in Deutschland die zweithäufigste Indikation zur Operation am Herzen dar (Funkat et al., 2012).

1.2 Ätiologie und Klinik der Aortenklappendefekte

Erkrankungen der Herzklappen des linken Herzens machen den Großteil der Herzklappenfehler aus. Am häufigsten betroffen ist die Aortenklappe, gefolgt von der Mitralklappe, während Herzklappenfehler der Pulmonal- und Trikuspidalklappe seltener sind. Prinzipiell wird bei Herzklappenfehlern zwischen zwei verschiedenen Manifestationsformen unterschieden: Stenose oder Insuffizienz.

Die Aortenklappenstenose stellt dabei in den Industrieländern die häufigste Form dar und weist bei den über 65-jährigen eine Inzidenz von 2 bis 3 Prozent auf (Stewart et al., 1997). Hierbei ist die Öffnungsfläche der Klappe verringert. Es kommt mit zunehmender Stenose zu einer Behinderung des antegraden Blutflusses und auf Dauer zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz. Dabei verspüren die Patienten im Anfangsstadium der Erkrankung kaum Symptome, eventuell eine verringerte Belastbarkeit und Atemnot bei körperlicher Anstrengung. Erst im Verlauf der Erkrankung kommt es regelhaft zu hämodynamischen Auswirkungen und Symptomen. Dazu zählen unter anderem Schwindel, Synkope, pektanginöse Beschwerden und Zeichen einer globalen Herzinsuffizienz, welche bis hin zum plötzlichen Herztod führen kann (Herold, 2012).

Als Hauptursache der Aortenklappenstenose gilt die degenerative Kalzifikation trikuspidaler Aortenklappen im Alter. In zahlreichen Studien konnte dabei gezeigt werden, dass Risikofaktoren und Pathophysiologie der generalisierten Atherosklerose zahlreiche Parallelen zur Aortenklappenstenose aufweisen. So erhöhen unter anderem Nikotinkonsum, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie das Risiko, eine Aortenklappenstenose auszubilden (Stewart et al., 1997) (Agmon et al., 2001) (Poggianti et al., 2003) .

Bei jüngeren Patienten findet sich als Ursache für eine Aortenklappenkalzifizierung oft auch eine angeborene bikuspidale Anlage der Klappentaschen. Hier kommt es aufgrund der veränderten Hämodynamik zu einer erhöhten mechanischen Beanspruchung und in Folge dessen zu einer vorzeitigen Degeneration. Eine weitere Ursache erworbener Herzklappenvitien ist das rheumatische Fieber. Durch eine autoimmune Reaktion, ausgelöst durch β -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe A, kommt es zu einer Schädigung des Herzens (Kaplan et al., 1964). In der westlichen Welt stellt dieses Krankheitsbild eine recht seltene Komplikation dar, da die adäquate antibiotische Therapie von Streptokokkeninfektionen die Inzidenz in den Industrieländern dramatisch senken konnte. Vor allem in Entwicklungsländern bleibt es jedoch weiterhin ein ernstes gesundheitliches Problem (Steer and Carapetis, 2009).

Neben der Stenose stellt die Insuffizienz die zweite Form der Klappendefekte dar. Bei der Aortenklappeninsuffizienz kann sich während der Diastole die Klappe nicht vollständig schließen, es kommt zu einem retrograden Blutfluss zurück in den Ventrikel und damit zu einer Volumenbelastung des linken Herzens. Die Folgen sind eine exzentrische linksventrikuläre Hypertrophie, die bis zur Herzinsuffizienz führt. Mögliche Ursachen einer Aortenklappeninsuffizienz sind entzündliche Prozesse, wie z.B. die Endokarditis, sowie degenerative und rheumatische Veränderungen (Herold, 2012).

1.3 Therapieoptionen der Klappenvitien

Im Anfangsstadium der Aortenklappenerkrankungen ist eine konservative Therapie indiziert. Hauptziel ist es dabei, die vorhandenen Risikofaktoren zu kontrollieren, z.B. durch Nikotinkarenz oder durch Blutdruckregulation.

Eine kausale Therapie ist lediglich durch eine operative oder interventionelle Versorgung möglich und ist bei den Patienten mit einer erheblichen Besserung der Lebensqualität verbunden (Shan et al., 2013). Ein Aortenklappenersatz ist im Rahmen einer Aortenklappenstenose indiziert, wenn die linksventrikuläre Ejektionsfraktion unter 50 Prozent gesunken ist, ein Patient mit schwerer Aortenklappenstenose (Öffnungsfläche $< 1 \text{ cm}^2$) aufgrund der progredienten Herzinsuffizienz Symptome entwickelt hat oder aufgrund einer anderen

Erkrankung (z.B. einer ausgeprägten Koronarstenose) eine Operation am Herzen durchgeführt werden soll (ESC/EACTS Guidelines, 2012). Dabei muss bei jedem Patienten je nach Alter, Komorbiditäten und Lebenserwartung individuell evaluiert werden, ob er für einen offen-chirurgischen Klappenersatz in Frage kommt. Alternativen stellen der transapikale oder transfemorale Aortenklappenersatz (TAVI) dar. Hierbei wird über eine Punktion der linksventrikulären Herzspitze bzw. der *Arteria femoralis* ein Katheter antegrad durch das linke Herz bzw. retrograd durch die Aorta bis zur Aortenklappe vorgeschoben. Die körpereigene, stenosierte Aortenklappe wird durch eine Ballonvalvuloplastie erweitert und simultan wird ein Stent mit integrierter Herzklappenprothese in der Position der erkrankten Klappe implantiert.

Unabhängig vom gewählten Zugangsweg sind die aktuell klinisch verfügbaren Implantate aus verschiedenen Gründen limitiert. Dies wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

1.4 Herzklappenimplantate

1.4.1 Die mechanische Herzklappenprothese

Der erste offen-chirurgische Aortenklappenersatz wurde 1960 von Dwight Harken durchgeführt. Verwendet wurde eine so genannte Kugelprothese, eine Silikonkugel in einem kleinen Käfig aus Metall, welche als Ersatzventil für die beschädigte Herzklappe diente (Harken and Soroff, 1960) (Murtra, 2002). Die Nachteile dieses Modells waren vor allem die schlechten hämodynamischen Eigenschaften, so dass heute primär die so genannte Doppelflügelprothese Verwendung findet. Sie ist je nach Durchmesser des Klappenringes in verschiedenen Größen verfügbar und wird über einen äußeren Ring aus synthetischem Gewebe, wie z.B. Teflon, am Herzen vernäht. Der Vorteil der mechanischen Herzklappenprothesen liegt in ihrer ausgezeichneten Haltbarkeit (Smith et al., 1993) (Baudet et al., 1995), die bei *in vitro*-Versuchen mehrere Jahrzehnte beträgt. Als größter Nachteil gilt jedoch die lebenslang notwendige strikte Antikoagulation nach Implantation der Klappe, die mit einem erhöhten Risiko für Blutungs- und Thrombembolieereignisse einhergeht. Auch die Lautstärke des Klappenschlusstons, welcher je nach Modell sogar auf die Lebensqualität der Patienten Einfluss nimmt, kann einen Nachteil mechanischer

Klappen darstellen (Golczyk et al., 2010). Somit findet heute, vor allem bei Patienten mit einem erhöhten Blutungsrisiko, beziehungsweise bei Patienten mit erhöhtem thromboembolischen Risiko, im Falle von Kontraindikationen gegen orale Antikoagulation (z.B. geplante Schwangerschaft) und insbesondere bei älteren Patienten die biologische Herzklappe immer häufiger Verwendung (ESC/EACTS Guidelines, 2012).

1.4.2 Die biologische Herzklappenprothese

Zur Gruppe der biologischen Herzklappen gehören die *post mortem* entnommenen aortalen *Allografts* von menschlichen Spendern. Daneben werden in manchen Situationen pulmonale *Autografts* verwendet – z.B. im Rahmen der sog. Ross-Operation. Hier wird an die Stelle der erkrankten Aortenklappe die körpereigene Pulmonalklappe eingesetzt. Im rechten Herzen wird dann ein *Allograft* an die Stelle der Pulmonalklappe implantiert.

Neben *Allo-* und *Autografts* kommen vor allem jedoch porcine, bovine und equine Bioprothesen von Tieren zum Einsatz. Verwendet werden aus dieser Gruppe der *Xenografts* vor allem native Herzklappen von Schweinen oder künstlich hergestellte Klappen aus Rinderperikard. Diese Prothesen werden meistens in Kombination mit einem Geometrie-erhaltenden Stent implantiert. Neuere Modelle ohne Stent weisen zwar eine verbesserte Hämodynamik auf (Burgazli et al., 2013), konnten aber bisher in Langzeitstudien kein verbessertes *Outcome* nachweisen (De Kerchove et al., 2007). Vor Implantation der *Xenografts* müssen die Präparate mit Glutaraldehyd chemisch fixiert werden. Dadurch wird eine verbesserte mechanische Stabilität der Prothese erreicht, gleichzeitig aber vor allem einer immunogenen Abstoßungsreaktion des körperfremden Gewebes entgegengewirkt. Die Toxizität des Glutaraldehyds kann anschließend durch verschiedene biochemische Verfahren auf ca. 20 Prozent reduziert werden, um eine Wiederbesiedlung der Prothese *in vivo* zu ermöglichen (Gendler et al., 1984) (Fluß, 2007).

In der heutigen Herzchirurgie gelten für die Aortenposition menschliche *Allografts* als Goldstandard. Sie liefern gute funktionelle Langzeitergebnisse (O'Brien et al., 1995) (O'Brien et al., 2001), sie sind im Gegensatz zu den mechanischen Klappen geräuschlos (Golczyk et al., 2010) und benötigen vor allem keine lebenslange Antikoagulation. Ihre Verfügbarkeit ist jedoch stark limitiert. Der große Nachteil aller bislang verfügbaren biologischen Herzklappenprothesen besteht in ihrer eingeschränkten Haltbarkeit, die bei Erwachsenen zwischen 10 und 15 Jahren liegt (Ross, 1995) (Yacoub et al., 1995). In jüngeren Patienten kommt es sogar zu einer beschleunigten Degeneration der Implantate, die eine frühere Reoperation nötig macht und damit wiederum auch die Mortalität erhöht (Clarke et al., 1993). In mehreren Studien konnte dabei nachgewiesen werden, dass diese frühzeitige Prothesendegeneration durch Empfänger-spezifische Immunreaktionen getriggert wird (Hoekstra et al., 1996) (Hogan et al., 1996). Analog dazu konnte auch in Tierversuchen bei Ratten gezeigt werden, dass es bei allogenen transplantierten Aortenklappen frühzeitig zu einer immungetriggerten Fibrosierung und Verdickung der Klappensegel kommt (Green et al., 1998). Bei Säuglingen und Kindern mit Herzklappenvitien sind des Weiteren, bedingt durch das Wachstum des Herzens, regelmäßige Reoperationen nötig.

Der Bedarf an neuen Prothesentypen, die bisherige Limitierungen überwinden, ist entsprechend groß. Zu den Eigenschaften einer idealen Prothese zählen zum einen ein niedriges thrombogenes Potential, welches keine lebenslange Antikoagulation voraussetzt, zum anderen eine unbeschränkte Haltbarkeit sowie gute hämodynamische Eigenschaften. Sie sollte bei Implantation im Kindesalter zusammen mit dem Patienten mitwachsen, bzw. in der Lage sein, sich bei Schädigung zu regenerieren. Ferner darf sie nicht für vorzeitige Prothesendegeneration anfällig sein (Harken, 1989) (Teebken et al., 2005) (Knight et al., 2008).

1.5 Tissue Engineering

Das Forschungsgebiet des *tissue engineering*s versucht eben diese Limitierungen herkömmlicher Herzklappen zu überwinden. Eine hierfür oft verwendete Definition nach Langer und Vacanti lautet: „*An interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function or a whole organ.*” (Langer and Vacanti, 1993). Ziel ist es also demnach durch Gewinnung und Modifizierung körpereigener Zellen und Gewebe biologische Matrizen herzustellen, die entweder *in vitro* oder *in vivo* mit Empfängerzellen besiedelt werden können.

Durch den Einsatz von *tissue engineering* erhofft man sich biologische Herzklappen mit einer hohen Verfügbarkeit herstellen zu können, die gleichzeitig die oben genannten Anforderungen an eine ideale Prothese erfüllen. Im Jahr 1965 hat Barratt-Boyes ein standardisiertes Protokoll zur Gewinnung und Aufarbeitung eines humanen *Allografts* veröffentlicht, welches die Sterilisation und Gefriertrocknung des Implantats beschreibt (Barratt-Boyes, 1965). Durch dieses Verfahren konnte das Problem der immungetriggerten vorzeitigen Degeneration der biologischen Herzklappenprothesen jedoch nicht behoben werden, da das Immunsystem des Empfängers die zellulären Bestandteile des Implantats weiterhin als körperfremd erkennt (Welters et al., 2002). Durch eine so genannte Dezellularisierung der Explantate vor Implantation im Organismus kann durch die Elimination zellgebundener Antigene, wie z.B. des Leukozytenantigen-Systems oder der Alpha-Gal-Epitope, die Immunantwort *in vivo* jedoch signifikant verringert werden (Shaddy et al., 1996) (Green et al., 1998) (Knight et al., 2008). Mittels Versuchen in einem Rattenmodell konnte ebenso nachgewiesen werden, dass durch die Dezellularisierung sowohl die Immunreaktion des Empfängertieres als auch die retrovalvuläre Thrombusbildung reduziert wird (Grauss et al., 2003). Durch die Dezellularisierung von Gewebe kann man also, unabhängig vom Spender, zellfreie Matrizen produzieren, die vom Immunsystem des Empfängers nicht als körperfremd erkannt werden.

Zurzeit existieren viele verschiedene Dezellularisierungsprotokolle, die je nach Gewebe modifiziert werden müssen. Einige Protokolle verwenden dabei eine Kombination aus Trypsin / Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) über einen Zeitraum von 24-48 h (Schenke-Layland et al., 2003). Eine erfolgreiche Dezellularisierung humaner und porciner Herzklappen konnte ebenso durch eine Behandlung basierend auf Triton-X 100 und Desoxyribonuklease erreicht werden (Rieder et al., 2005). Neben einer vollständigen Eliminierung aller zellulären Bestandteile ist es jedoch genauso wichtig, dass die strukturelle Integrität der extrazellulären Matrix durch die Dezellularisierung nicht kompromittiert wird. Unter diesem Aspekt konnten vor allem Detergenzien-basierte Protokolle gute Ergebnisse liefern (Lichtenberg et al., 2006) (Tudorache et al., 2007) (Bloch et al., 2012). Um zu ermitteln, welches dieser Verfahren die besten Ergebnisse liefert, wurden die verschiedenen Protokolle in einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe untereinander verglichen: an ovinen Aortenklappen konnten dabei unter Verwendung von Natriumdodecylsulfat (auch als Natriumlaurylsulfat bzw. SDS bekannt) und Desoxycholsäure (DCA) im direkten Vergleich mit anderen Protokollen die besten Ergebnisse erzielt werden (Tschierschke, 2010). Das Protokoll wurde in Anlehnung an ein von Haase *et al.* verwendetes Protokoll etabliert (Haase et al., 2003). Es wurde dabei auch gezeigt, dass die *in vivo*-Zytotoxizität der verwendeten Detergenzien durch intensives Auswaschen der Explantate auf ein für Zellen unschädliches Niveau gesenkt werden kann (Cebotari et al., 2010). Auch im Rahmen der grundlegenden Vorversuche für diese Arbeit haben wir im Kleintiermodell an Ratten eine modifizierte Version dieses Protokolls schon erfolgreich eingesetzt (Assmann et al., 2012a). Aufgrund dieser Datenlage haben wir uns auch in dieser Arbeit dafür entschieden ein Detergenzien-basiertes Dezellularisierungsprotokoll zu verwenden, basierend auf SDS und DCA (siehe 2.2.3).

1.6 Klinischer Nutzen des Tissue Engineering

In bisherigen Studien konnten durch *tissue engineering* hergestellte pulmonale und aortale Herzklappen gute funktionelle Ergebnisse liefern, sowohl *in vitro* (Lichtenberg et al., 2006) als auch *in vivo* (Akhyari et al., 2010). Interessant ist aber vor allem, dass auch erste klinische Versuche mit dezellularisierten Pulmonalklappen mittelfristig gute Ergebnisse gezeigt haben (Cebotari et al., 2006). Im direkten Vergleich zwischen dezellularisierten pulmonalen *Homografts* (DPH), Glutaraldehyd-fixierten bovinen *Xenografts* und kryopräservierten *Homografts* bei jungen Patienten konnten da Costa et al. 2011 nachweisen, dass sämtliche dezellularisierte Prothesen ($n = 38$) nach 5 Jahren funktionell intakt waren. Hingegen blieben lediglich 86 ± 8 Prozent der konventionellen *Xenografts* ($n = 38$) und 88 ± 7 Prozent der *Kryografts* ($n = 38$) in diesem Zeitraum frei von der Notwendigkeit einer Explantation der Prothese. In einer ähnlichen Studie mit dezellularisierten Prothesen zeigten die implantierten DPH ein adaptives Wachstum bei normaler Klappenöffnungsfläche (Cebotari et al., 2011). Die Fähigkeit der Prothese, mit dem Patienten zu wachsen und zu regenerieren, stellt dabei einen wichtigen Aspekt des *tissue engineering*s dar, vor allem im Hinblick auf jüngere Patienten.

Dennoch besteht nach wie vor Optimierungsbedarf bei der Herstellung, Modifikation und Implantation *tissue engineerter* Prothesen. Nach Implantation dezellularisierter porciner Herzklappen („SYNERGRAFT“, Cryolife Inc. USA) in die Pulmonalklappenposition pädiatrischer Patienten kam es zur frühzeitigen strukturellen Degeneration und Kalzifikation (Simon et al., 2003). Diese Prozesse könnten möglicherweise auf eine infolge unvollständiger Dezellularisierung persistierende Thrombo- und Immunogenität der Prothese zurückzuführen sein (Meyer et al., 2006) (Kasimir et al., 2006).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Herzklappenersatzeingriffe in der heutigen Gesellschaft zunehmend an Bedeutung gewinnen. Die verschiedenen Herzklappenprothesen, die aktuell zur Auswahl stehen, weisen jedoch immer noch erhebliche Nachteile auf. Obwohl *tissue engineering* möglicherweise in der Lage ist, den Wunsch nach einer neuen, verbesserten Prothese zu erfüllen, gibt es noch viele offene Fragen. So besteht bis heute kein Konsens darüber, welches

Dezellularisierungsprotokoll die besten Ergebnisse liefert oder inwiefern eine präoperative Behandlung der dezellularisierten Prothesen ihre Biofunktionalität verbessern könnte.

1.7 Fragestellung dieser Arbeit

Wie oben beschrieben, kann die Persistenz von Spenderzellen im dezellularisierten Gewebe eine Immunreaktion auslösen. Neben einer unvollständigen Dezellularisierung können aber auch freigelegte extrazelluläre Matrixproteine im Lumen der Prothese als Auslöser von Inflammation und Thrombusbildung in Frage kommen (Rieder et al., 2005) (Zhou et al., 2010), wenn sie in direkten Kontakt mit dem Blut des Empfängertieres kommen. Um dem entgegenzuwirken, ist es für dezellularisierte *Grafts* von großer Bedeutung, dass die luminale Fläche der Prothese nach Implantation möglichst schnell durch autologe Endothelzellen besiedelt wird. Um eine solche rasche Wiederbesiedlung einzuleiten, erscheint eine Oberflächenbeschichtung mit biofunktionellen Proteinen, wie z.B. Fibronektin (FN), Fibrin oder dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), vielversprechend. Dabei steht das Glykoprotein FN im Zentrum dieser Arbeit. Als Protein der extrazellulären Matrix spielt es eine wichtige Rolle bei Vorgängen der Zelladhäsion und –migration, sowie bei Gewebsreparaturen und in der Immunabwehr (Vaheri, 1980).

FN liegt in zwei verschiedenen Formen vor: In der Leber wird das lösliche FN produziert, welches frei im Blutplasma schwimmt und vor allem bei der Wundheilung und Blutgerinnung zum Einsatz kommt (Grinnell, 1984). Neben dieser freien Form gibt es das unlösliche FN, welches von Endothelzellen, Makrophagen und Chondrozyten produziert wird. Es bindet sich an Kollagenfasern der extrazellulären Matrix und spielt eine wichtige Rolle bei Vorgänge der Zelladhäsion und –migration (Pankov and Yamada, 2002). Sowohl für die FN-Beschichtung artifizierender Gefäßprothesen, als auch für die VEGF-Behandlung *tissue engineerter* Gefäßprothesen liegen bereits zahlreiche positive Berichte vor welche über eine beschleunigte Adhäsion von Empfängerzellen *in vivo* berichten (Budd et al. 1990) (Shimada et al., 2004) (Zhou et al., 2009) (Visscher et al., 2012).

Eben diese adhäsionsfördernden Eigenschaften des FN wollten wir uns zunutze machen, um die *in vivo*-Endothelbildung in dezellularisierten Gefäßkonduits zu beschleunigen und damit letztlich die Biokompatibilität der Prothesen zu verbessern.

Im Rahmen der Vorversuche haben wir ein standardisiertes Kleintiermodell mit Wistar-Ratten etabliert, welches die Implantation dezellularisierter Aortenkonduits in Empfängertiere mit einer hohen operativen Erfolgsquote erlaubt (Assmann et al., 2012a). Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, in diesem Kleintiermodell die Auswirkungen einer FN-Beschichtung auf infrarenal implantierte, dezellularisierte Aortenkonduits zu beschreiben (n = 18). Als Kontrollgruppe (n = 18) dienten Tiere mit dezellularisierten, unbeschichteten Implantaten. Zum einen wurde die *in vivo*-Persistenz des FN beobachtet, zum anderen die funktionelle Relevanz der Beschichtung. Durch die Konjugation des FN mit einem fluoreszierenden Farbstoff konnten wir die Persistenz der FN-Beschichtung auch nach mehreren Wochen bestimmen. Durch verschiedene histologische und immunohistologische Verfahren wurden strukturelle sowie funktionelle Implantat-Veränderungen nach einem, 7, 28 und 56 Tagen postoperativ dargestellt. Für die Analyse der biologischen Prozesse auf genomischer Ebene wurde die quantitative *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) angewandt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Merck Darmstadt, Deutschland
AcriFix 190	ThyssenKrupp Köln, Deutschland
Acifix CO 3075 rot	ThyssenKrupp Köln, Deutschland
Alcianblau	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Aluminiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Betaisodona	Mundipharma Limburg an der Lahn, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Brilliant Crocein R	Waldeck Münster, Deutschland
Calcium Assay Kit	Cayman Chemical Company Ann Harbor, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
DQ-Gelantine	Invitrogen Eugene, USA
EDTA	Merck Darmstadt, Deutschland
Eisenchlorid	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Eosin B	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure	Merck Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Zentralapotheke HHU Düsseldorf Düsseldorf, Deutschland
Fibronektin	Isoliert im Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin HHU Düsseldorf, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland

Häm Gill 3	Thermo Scientific Kalamazoo, USA
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Heparin	Rotexmedica Trittau, Deutschland
Histo Kitt Eindeckmedium	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	Actaris Langenfeld, Deutschland
Isopropanol	Merck Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid	Merck Darmstadt, Deutschland
Kaliumjodid	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
NaCl-Injektionslösung	B Braun Melsungen, Deutschland
Nagellack	dm-Drogeriemarkt Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Merck Darmstadt, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Natriumlaurylsulfat	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Nuclear Fast Red	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen Carlsbad, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Platinum SYBR Green PCR Mix	Invitrogen Carlsbad, USA
Ringerlösung Jonosteril	Fresenius Bad Homburg, Deutschland
Safran du Gâtinais	Waldeck Münster, Deutschland
Salzsäure	Merck Darmstadt, Deutschland
Säurefuchsin	Waldeck Münster, Deutschland

Silbernitrat	Merck Darmstadt, Deutschland
Tissue Tek Einbettmedium	Sakura Finetek Alphen aan den Rijn, Niederlande
TRIS HCl	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
Trizol	Invitrogen Carlsbad, USA
Tween 20	Merck Darmstadt, Deutschland
Vectashield DAPI Eindeckmedium	Vector Labs Peterborough, England
Xylol	Merck Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primärantikörper

anti-von-Willebrand-Faktor (vWF)	DAKO Hamburg, Deutschland
anti-alpha-smooth muscle actin (SMA)	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
anti-CD3	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
anti-CD68	Abcam Cambridge, England
anti-Syndecan-3	Abcam Cambridge, England
anti-Desmin	Abcam Cambridge, England
anti-Vimentin	Abcam Cambridge, England

2.1.2.2 Sekundärantikörper

Alexa488 anti-Maus	Invitrogen Carlsbad, USA
Alexa488 anti-Kaninchen	Invitrogen Carlsbad, USA
Alexa546 anti-Maus	Invitrogen Carlsbad, USA
Alexa546 anti-Kaninchen	Invitrogen Carlsbad, USA

2.1.3 Primersequenzen

Alle verwendeten Primer wurden von Invitrogen (Carlsbad, USA) erworben.

Primer	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz
Beta-Aktin	5'-CCGCGAGTACAACCTTCTTG-3'	5'-GCAGCGATATCGTCATCCA-3'
Alpha-smooth muscle actin	5'-GCTCTGGTGTGTGACAATGG-3'	5'-CCCCACATAGCTGTCCTTTT-3'
Vascular cell adhesion molecule-1	5'-TGGGAAACTGGAAAGAGGAA-3'	5'-CAGGAGCCAAACACTTGACC-3'
Intercellular cell adhesion molecule-1	5'-GTCAAACGGGAGATGAATGG-3'	5'-CCGCAATGATCAGTACCAAC-3'
Transforming growth factor-beta-1	5'-TGGAGCCTGGACACACAGTA-3'	5'-GCTTGCGACCCACGTAGTAG-3'
CD39	5'-GGGCCTATGGGTGGACTACT-3'	5'-CAAAGGTTGCCTGTTTCTGG-3'
CD73	5'-ACGTGTCCATGTGCATTGTAA-3'	5'-GGTTCTCCCAGGTGATGGTA-3'
Osteopontin	5'-AAGCCTGACCCATCTCAGAA-3'	5'-ATGGCTTTCATTGGAGTTGC-3'
Osteokalzin	5'-AAGCAGGAGGGCAGTAAGGT-3'	5'-GTCCGCTAGCTCGTCACAAT-3'
Alkaline Phosphatase	5'-GCACTCCCACTATGTCTGGAA-3'	5'-AGGGAAGGGTCAGTCAGGTT-3'
Integrin-alpha-4	5'-GCCCCCTGTTACCAAGATTT-3'	5'-GCCGGTCCAGTACGATGAT-3'
Integrin-alpha-5	5'-CCCAAAGGAAACCTCACCTA-3'	5'-ACGGCATAGCCAAAATAGGA-3'

2.1.4 Geräte & Verbrauchsmaterialien

96-Loch-Platte	Applied Biosystems Carlsbad, USA
Abdecktücher	Hartmann Heidelberg, Deutschland
Agilent Kit	Agilent Technologies Santa Clara, USA
Arterieller Seldingerdraht	Vygen Elouven, Frankreich
Autoklav	VX-95, Systec Wettenberg, Deutschland
Chirurgische Instrumente	Aesculap Tuttlingen, Deutschland
Deckplättchen	Engelbrecht Edermünde, Deutschland
Einbettkästchen	Sakura Finetek Alphen aan den Rijn, Niederlande
Falcon Röhrchen	Greiner Bio-One Kremsmünster, Österreich
Fluoreszenzmikroskop	DM2000, Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
Hydrophober Markierstift	DAKO Glostrup, Dänemark
Incidur-Spray	Ecolab Wien, Österreich
Injektionskanüle	Terumo Leuven, Belgien
Kleintier-Ventilator	Föhr Medical Instruments Seeheim, Deutschland
Kryo-Mikrotom	CM 1950, Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera	DFC 425C, Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
Mikrozentrifugenröhrchen	Screensen BioScience Salt Lake City, USA
Nahtmaterial	Johnson & Johnson New Brunswick, USA
Objektträger	Marienfeld-Superior Lauda-Königshofen, Deutschland
OP-Mikroskop	C-W10xA/22, Nikon Tokio, Japan
PCR-Thermozykler	StepOnePlus, Applied Biosystems Carlsbad, USA
Photospektrometer	BioPhotometer plus, Eppendorf Hamburg, Deutschland
Pipetten	Starlab Hamburg-Rahlstedt, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf Research Hamburg, Deutschland

Quantitec Reverse Transcription Kit	Qiagen Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen Hilden, Deutschland
Rotationsschüttler	Edmond Bühler Tübingen, Deutschland
Spritzen	B Braun Melsungen, Deutschland
Sterile Kompressen	Hartmann Heidelberg, Deutschland
Sterile Werkbank	BSB 4, Gelaire Sydney, Australien
Ultraschallgerät	HD 11XE, Philips Amsterdam, Niederlande
Vaporisator	Dräger Lübeck, Deutschland
Venenverweilkatheter	B Braun Melsungen, Deutschland
Versuchstier-Rasierer	Aesculap Tuttlingen, Deutschland

2.1.5 Gebrauchslösungen

Dezellularisierung

Dezellularisierungslösung 1

5 g Natriumlaurylsulfat
5 g Natriumdeoxycholat
0,5 g Natriumazid
ad 1000 ml Aqua dest.

Dezellularisierungslösung 2

0,5 g Natriumazid
ad 1000 ml Aqua dest.

Von Kossa-Färbung

Silbernitrat-Lösung

1 g Silbernitrat
ad 100 ml Aqua dest.

Natriumthiosulfat-Lösung

5 g Natriumthiosulfat
ad 100 ml Aqua dest.

Nuclear Fast Red

0,1 g Nuclear Fast Red
5 g Aluminiumsulfat
ad 100 ml Aqua dest.

In Situ-Enzymographie

TRIS-Pufferlösung

1,2 g TRIS HCl
294 mg Calciumchlorid-Dihydrat
1,8 g Natriumchlorid
10 ml Triton X-100
ad 190 ml Aqua dest.

Movat Pentachrom-Färbung

Alkalischer Alkohol	40 ml 30% Ammoniumhydroxid ad 360 ml 96% Ethanol
Bouinsche Lösung	100 ml 40% Formaldehyd 20 ml 100% Essigsäure ad 300 ml Pikrinsäure
Alcianblau	2 g Alcianblau ad 200 ml Aqua dest.
Weigerts Eisenhämatoxylin	40 ml Eisenchloridlösung 20 ml Jodlösung ad 60 ml Alkoholisches Hämatoxylin
Eisenchloridlösung	12,4 g Eisenchlorid 5 ml 35% Salzsäure ad 500 ml Aqua dest.
Jodlösung	10 g Jod 20 g Kaliumjodid ad 500 ml Aqua dest.
Alkoholisches Hämatoxylin	10 g Hämatoxylin ad 500 ml 96% Ethanol
Crocein-Säurefuchsin	20 ml Säurefuchsin ad 80 ml Brilliant Crocein R
Brilliant Crocein R	4 g Brilliant Crocein R ad 400 ml Aqua dest.
Säurefuchsin	0,5 g Säurefuchsin 2,5 ml 100% Essigsäure ad 500 ml Aqua dest.
Phosphorwolframsäure	25 g Phosphorwolframsäure ad 500 ml Aqua dest.
Eisessig	5 ml 100% Essigsäure ad 495 ml Aqua dest.
Alkoholischer Safran	12 g Safran du Gatinais ad 200 ml 100% Ethanol

2.2 Methoden

Zur besseren Übersichtlichkeit wird im folgenden Teil auf detaillierte Angaben zu Hersteller und Herkunft der Materialien verzichtet. Eine ausführliche Material- und Geräteliste ist unter 2.1 aufgeführt.

2.2.1 Einteilung der Versuchsgruppen

Ausgewachsene männliche Wistar-Ratten (n = 72, Gewicht 200-250 g) wurden von der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf erworben und *ad libitum* gefüttert. Sämtliche Versuche wurden mit Erlaubnis des Landesamtes für Natur-, Umwelt und Verbraucherschutz durchgeführt (Referenz-Nummer: 87-51.04.2010.A068).

Es wurden in dieser Arbeit zwei Gruppen miteinander verglichen, bestehend aus der Versuchsgruppe FN (FN-Gruppe; dezellularisierte und anschließend FN-beschichte Gefäßkonduits, n = 18) sowie der Kontrollgruppe (dezellularisierte Gefäßkonduits ohne FN-Beschichtung, n = 18). Aus beiden Gruppen wurden zu 4 verschiedenen Zeitpunkten nach einem Tag, 7 Tagen, 28 Tagen und 56 Tagen jeweils 3 Tiere euthanasiert und die implantierten Gefäßkonduits untersucht. Aus Kontroll- und FN-Gruppe wurde des Weiteren in jeweils 6 Tieren nach 56 Tagen die Aktivität bestimmter Adhäsions-, Kalzifikations- und Entzündungsmarker mittels qRT-PCR gemessen.

2.2.2 Explantation zur Konduitgewinnung

Die Spenderratten (n = 36) wurden unter einer Glasglocke durch eine Kohlenstoffdioxidintoxikation euthanasiert, anschließend wurden das Herz sowie der Aortenbogen und der proximale Teil der *Aorta descendens* durch eine mediane Thorakotomie *en bloc* explantiert. *Ex situ* haben wir die Aortenbögen mit Hilfe eines Stereomikroskops auf Ebene der Aortenklappe vom Myokard so freigelegt, dass nur ein dünner Myokardkragen das proximale Ende des U-förmigen Konduits abschloss. Danach wurden die Konduits mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) versetzt und mit 12,5 IE/ml Heparin durchgespült.

Die Koronararterien wurden mit 8-0 nicht-resorbierbarem Monofilament ligiert, während die linke *Arteria carotis communis* und *Arteria subclavia* geclippt wurden. Der *Truncus brachiocephalicus* wurde zunächst offen gelassen, um eine bessere Perfusion mit Dezellularisierungslösung zu gewährleisten. Nach erfolgreicher Implantation wurde auch dieser Abgang geclippt.

2.2.3 Dezellularisierung der Gefäßkonduits

Für die Dezellularisierung der explantierten Konduits wurde ein Detergenzien-basiertes Dezellularisierungsprotokoll verwendet. Das Protokoll bestand aus vier 12-stündigen Zyklen in 0,5% Natriumlaurylsulfat + 0,5% Natriumdeoxycholat + 0,05% Natriumazid, gefolgt von 24 h in 0,05% Natriumazid sowie 72 h Auswaschen in PBS + 1% Streptomycin/Penicillin. Als Behälter wurden quadratische 250 ml-Flaschen benutzt, welche bis zu 4 Konduits und 25 ml Dezellularisierungslösung pro Konduit enthielten. Die Lösungswechsel wurden während der ersten zwei Tage nach Explantation alle 12 h und für die darauffolgenden drei Tagen alle 24 h durchgeführt. Jedes Mal, wenn eine neue Lösung verwendet wurde, wurde auch die Flasche gewechselt.

Dezellularisierungsprotokoll:

1. Tag 0 – 0 h – Dezellularisierungs-Lösung 1
2. Tag 0 – 12 h – Dezellularisierungs-Lösung 1
3. Tag 1 – 24 h – Dezellularisierungs-Lösung 1
4. Tag 1 – 36 h – Dezellularisierungs-Lösung 1
5. Tag 2 – 48 h – Dezellularisierungs-Lösung 2
6. Tag 3 – 72 h – PBS + 1% Streptomycin/Penicillin
7. Tag 4 – 96 h – PBS + 1% Streptomycin/Penicillin
8. Tag 5 – 120 h – PBS + 1% Streptomycin/Penicillin

Jene Lösungen, welche mit Natriumazid versetzt waren, wurden unter Einhalten der entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen unter einem Luftabzug gewechselt. Während der 72 h auswaschen ohne Natriumazid wurden die Lösungswechsel unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, um das Risiko einer Kontamination der Konduits zu reduzieren.

Für jeden Wechsel wurden autoklavierte Flaschen und Pinzetten verwendet. Während der gesamten Zeit wurden die Flaschen auf einem Rotationsschüttler bei 220 Umdrehungen pro Minute gelagert, um eine bessere Durchmischung der Dezellularisierungslösungen zu gewährleisten.

2.2.4 Beschichtung mit Alexa488-konjugiertem Fibronectin

Nach erfolgter Dezellularisierung und intensivem Auswaschen der Detergenzien wurden die Proben mit FN beschichtet. Das FN wurde zuvor im Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Düsseldorf aus humanem Blutplasma isoliert und anschließend mit grün-fluoreszierendem Alexa488 kovalent konjugiert. Verwendet wurde für diesen Vorgang ein von Huynh *et al.* eigens dafür entwickeltes Protokoll (Huynh *et al.*, 2013). Im Rahmen der etablierenden Vorversuche wurde das Beschichtungsverfahren bei verschiedenen FN-Konzentrationen (20, 50, 100 und 200 µg/ml) und Inkubations-Temperaturen (20°C und 37°C) getestet. Da die höheren FN-Konzentrationen jedoch nur eine unwesentlich bessere Beschichtung erreichten, haben wir uns für eine Konzentration von 50 µg FN pro ml PBS entschieden. Die Aortenkonduits der FN-Gruppe wurden nach erfolgter Dezellularisierung entsprechend bei 37°C in einer PBS-Lösung mit 50 µg/ml Alexa488-konjugiertem FN inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem 1 ml Proberöhrchen auf einem rotierenden Schüttler bei 220 Umdrehungen pro Minute.

2.2.5 Präoperative Kontrolle der Beschichtung

Zur präoperativen Erfolgskontrolle der FN-Beschichtung wurde aus jedem Konduit unmittelbar vor Implantation ein kleines endständiges Stück der *Aorta descendens* abgeschnitten und zur histologischen Weiterverarbeitung in Einbettmedium bei -20°C eingefroren. Mithilfe eines Kryo-Mikrotoms wurden Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt. Der Grad der FN-Beschichtung unmittelbar vor der Operation wurde in einer Dunkelkammer mithilfe eines Mikroskop-Systems mit angeschlossener Digitalkamera sowie der *Leica Application Suite 3.7 Software* unter standardisierten Belichtungszeiten festgehalten.

2.2.6 Infrarenale Reimplantation der Gefäßkonduits

Dezellularisierte und FN-beschichtete Aortenkonduits wurden bis zur Reimplantation maximal 48 h in einer heparinisierten Ringerlösung (12,5 IE/ml) gelagert. Die Empfängertiere (n = 36) wurden durch eine kurzzeitige Isofluran-Inhalation narkotisiert und mithilfe eines Seldinger-Drahtes und einer Venenverweilkanüle tracheal intubiert. Die Tiere wurden während der Operation mit einer Frequenz von 80 Atemzügen pro Minute und einem Tidalvolumen von 1,5 ml maschinell beatmet.

Ein Vaporisator ermöglichte die Beimischung von 2,0-2,5% Isofluran in die Atemluft der Ratte zur Aufrechterhaltung der Narkose. Das Operationsgebiet wurde rasiert und anschließend ein zentralvenöser Zugang über die rechte *Vena jugularis externa* des Empfängertieres gelegt und 300 IE pro kg Körpergewicht Heparin intravenös verabreicht. Eine mediane Laparotomie wurde durchgeführt, der Darm zur Seite verlagert, die *Aorta abdominalis* frei präpariert und unterhalb der Abgänge der beiden Nierenarterien abgeklemmt. Eines der dezellularisierten U-förmigen Aortenkonduits wurde nun, zunächst proximal, mithilfe von 10-0 nicht-resorbierbarem Monofilament durch eine End-zu-Seit-Anastomose mit der nativen, infrarenalen Aorta anastomosiert. Durch intermittierende Reperfusion der Hauptschlagader haben wir die Ischämiezeit der unteren Extremitäten unter 30 Minuten gehalten. Nachdem auch das distale Ende des Gefäßkonduits mit der Aorta anastomosiert war, haben wir die native Aorta zwischen den beiden Anastomosen ligiert um den Blutfluss über das implantierte Konduit zu verstärken (siehe Abb. 2). Der weiterhin offene *Truncus brachiocephalicus* wurde dazu genutzt, das Konduit vor Freigabe der Reperfusion zu entlüften, und anschließend geclippt.

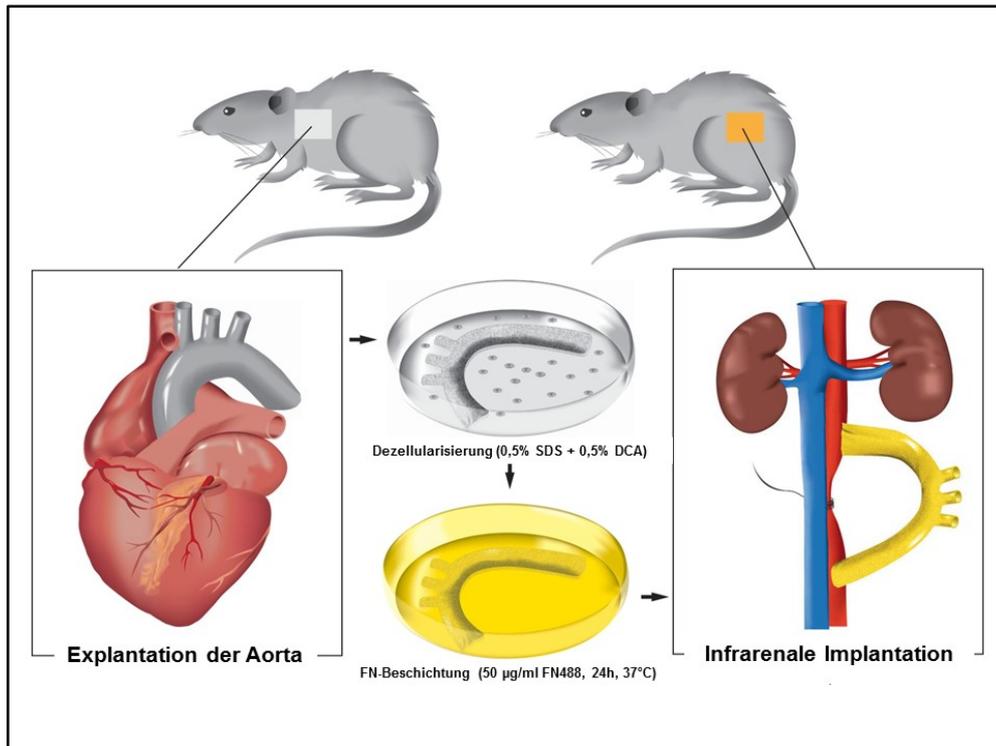


Abbildung 2 – Schematische Darstellung der Explantation mit anschließender Dezellularisierung und Oberflächenbeschichtung mit fluoreszenzmarkiertem FN. Das präparierte Aortenkonduit wurde infrarenal über End-zu-Seit-Anastomosen mit der nativen Aorta des Empfängertieres verbunden. (Übersetzt aus: Assmann et al., 2013)

Vor Verschluss des Abdomens wurde während einer Reperusionszeit von mindestens 10 Minuten klinisch der Blutfluss, vor allem der unteren Extremitäten, kontrolliert. Nach Extubation wurde die Ratte bis zum vollständigen Erwachen unter eine Wärmelampe platziert.

2.2.7 Funktionelle Evaluation der implantierten Konduits

Unmittelbar nach Implantation sowie vor Explantation der dezellularisierten Gefäßkonduits wurde der Blutfluss über das Konduit mithilfe von Doppler-Sonographie mit einem 15 MHz Schallkopf kontrolliert. Zudem haben wir im Rahmen der Vorversuche für diese Arbeit neben der Doppler-Sonographie auch an zwei Ratten eine Plastination des Gefäßsystems nach 8 Wochen *in vivo* durchgeführt. Dazu wurde der Blutkreislauf der Ratten zunächst mit Kochsalz gespült und anschließend roter Plastikleber langsam intraarteriell injiziert. Nach 30 Minuten wurde die untere Körperhälfte der Tiere abgetrennt und gehäutet.

Die Präparate wurden für 24 h in einer 25% Kaliumhydroxidlösung bei 50°C gelagert und anschließend luftgetrocknet. Durch die Kalilauge zersetzte sich das Weichteilgewebe der Ratte so, dass ausschließlich das plastinierte Gefäßsystem übrig blieb.

2.2.8 Abschließende Explantation der Gefäßkonduits

Zu den jeweiligen Explantationszeitpunkten (Postoperativer Tag 1, 7, 28 und 56) wurden die Tiere erneut intubiert und narkotisiert. Anschließend wurde das infrarenal implantierte Konduit analog zum Vorgehen in 2.2.6 freipräpariert. Über die native Aorta wurde das Implantat zunächst mit heparinierter PBS-Lösung gespült (12,5 IE/ml Heparin in PBS) und anschließend zusammen mit angrenzendem Empfängergewebe *en bloc* exzidiert. Die U-förmigen Konduits wurden vom Empfängergewebe getrennt und entweder für die weitere histologische Aufarbeitung in Einbettmedium bei -20°C eingefroren oder für PCR-Untersuchungen mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Histologie-Präparate wurden in der Mitte des Aortenbogens durchgeschnitten und separat eingebettet.

2.2.9 Histologie

2.2.9.1 Präparation der Proben

Die für die histologische Auswertung geplanten Konduits beider Versuchsgruppen wurden in Einbettmedium eingebettet und bei -20°C gelagert. Jedes Konduit wurde in *Aorta ascendens* (A) und *Aorta descendens* (B) geteilt und separat eingefroren. Region A und B wurden dann noch weiter in Subregionen unterteilt: A1 – Aortenklappe, A2 – *Aorta ascendens* und proximaler Teil des Aortenbogens, B1 – distaler Teil des Aortenbogens und *Aorta descendens*, B2 – distale Anastomose. Aus jeder dieser Subregionen wurden mit einem Kryo-Mikrotom gemäß Schneideprotokoll mehrere 6 µm- sowie 4 µm-Schnitte von drei repräsentativen Stellen mit 200 µm Abstand angefertigt und auf Glasobjektträger übertragen (siehe Abb. 3).

Zur histologischen Dokumentation wurde ein Mikroskop-System mit angeschlossener Digitalkamera wie unter 2.2.5 beschrieben verwendet. Unter standardisierten Belichtungszeiten wurden repräsentative Bilder aller Subregionen aufgenommen.

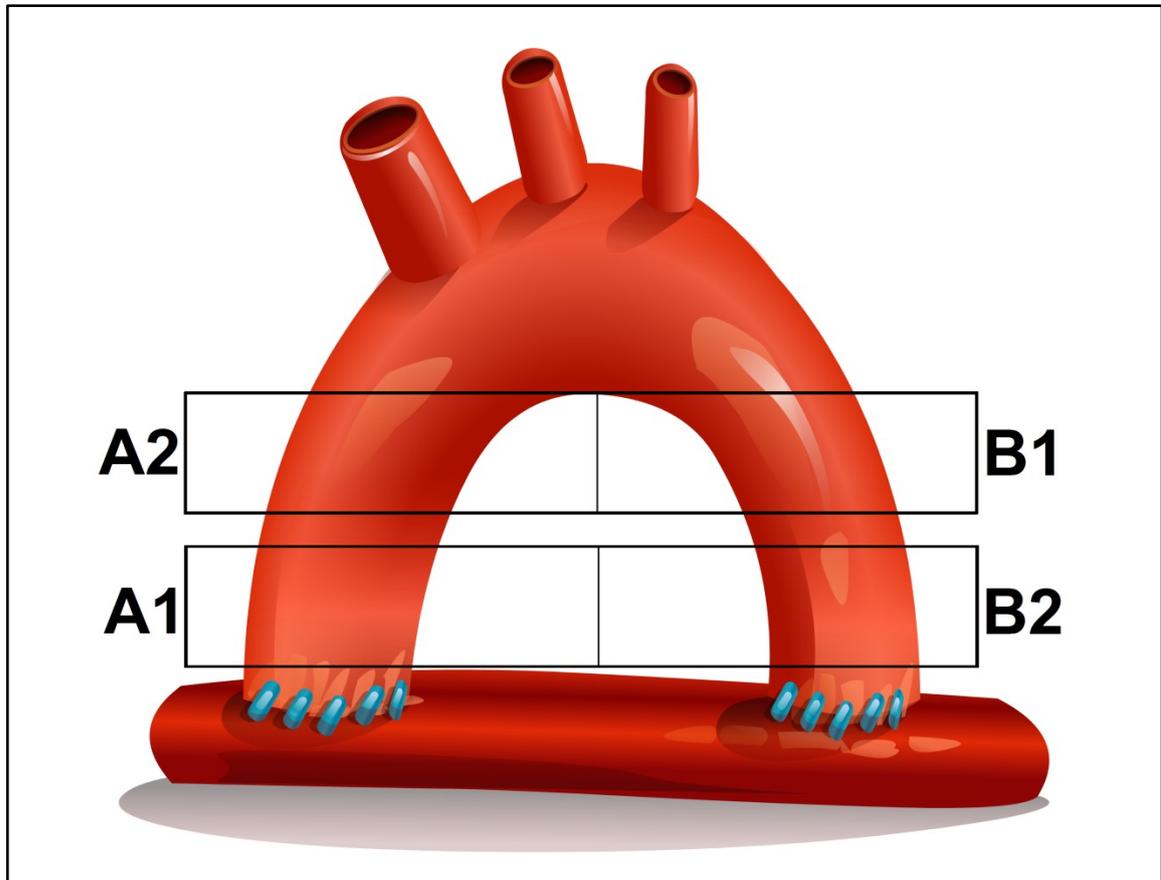


Abbildung 3 – Für die histologische Auswertung der Subregionen wurde ein standardisiertes Schneideprotokoll verwendet. Die innere Kurvatur des Aortenbogens wurde als Startpunkt für die Subregionen A2 und B1 definiert, während die Anastomosenregion als Endpunkt für A1 und B2 diente. An drei Lokalisationen mit jeweils 200 μm Abstand zueinander wurden innerhalb dieser vier Subregionen jeweils repräsentative 6 μm - sowie 4 μm -Schnitte angefertigt und auf Objektträgern eingefroren.

2.2.9.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) eignet sich gut, um eine histologische Übersicht zu bekommen. Der blaue Farbstoff Hämalaun färbt basophile Strukturen, vor allem Desoxyribonukleinsäuren im Zellkern, während das Eosin die azidophilen Strukturen, zum Beispiel Zellplasmaproteine, hellrot färbt.

Hämatoxylin-Eosin-Protokoll:

1. Fixierung mit 4% Paraformaldehyd für 10 min.
2. Hämatoxylin Gill 3, 1 min.
3. Aqua bidest., 1 min.
4. 5% Eisessigwasser, 1 min.
5. Aqua bidest., 1 min.
6. Unter laufendem Wasser bläuen, 2 Mal 1 min.
7. 70% Ethanol, 1 min.
8. Eosin B in 70% Ethanol, 10 min.
9. 70% Ethanol, 1 min.
10. 96% Ethanol, 2 Mal 1 min.
11. 100% Ethanol, 2 Mal 1 min.
12. 100% Xylol, 2 Mal 1 min.
13. Gefärbte Schnitte lufttrocknen lassen.
14. Eindecken mit Histo Kitt Eindeckmedium.

Um eventuelle histologische Unterschiede in den verschiedenen Regionen und Subregionen der Konduits entdecken zu können wurden die verschiedenen Subregionen separat untersucht. Wir haben am ersten, 7, 28 und 56 postoperativen Tag aus jeder Subregion jeweils drei 6 µm-dicke, repräsentative Kryoschnitte angefertigt. Diese lagen innerhalb ihrer Subregion im Abstand von 200 µm zueinander (siehe Abb. 3). Mit diesen Objektträgern wurden zunächst HE-Färbungen durchgeführt und dokumentiert. Analog zu dieser Methodik wurden auch für die von Kossa- und die Movat Pentachrom-Färbung 6 µm-Schnitte aus denselben Subregionen genutzt.

2.2.9.3 von Kossa-Färbung

Die von Kossa-Färbung dient dem Nachweis von Mineralsalzen im Gewebe. Die Silberionen aus dem Silbernitrat verbinden sich mit dem Phosphat im Gewebe zu Silberphosphat, welches sich unter Lichteinwirkung dunkelbraun färbt. Somit können eventuelle kalzifizierende Degenerationen im Gewebe aufgedeckt werden. Um die extrazelluläre Matrix und Zellkerne besser darstellen zu können, wurde nach initialer Inkubation in einer Silbernitratlösung auch eine Gegenfärbung mit Nuclear Fast Red durchgeführt.

Von Kossa-Protokoll:

1. Fixierung mit 4% Paraformaldehyd für 10 min.
2. Objektträger 20 min dicht unter einer 60 Watt Lampe mit 1% Silbernitratlösung in einem klaren Glasbehälter inkubieren.
3. Mehrmals mit Aqua bidest. abwaschen.
4. 5% Natriumthiosulfat, 5 min.
5. Mit Aqua bidest. abwaschen.
6. Nuclear Fast Red Lösung, 5 min.
7. Mit Aqua bidest. abwaschen.
8. Aufsteigende Alkoholreihe: 70% Ethanol, 96% Ethanol, 2 Mal 100% Ethanol, 2 Mal 100% Xylol je 1 min.
9. Eindecken mit Histo Kitt Eindeckmedium.

2.2.9.4 Movat Pentachrom-Färbung

Die Movat Pentachrom-Färbung ermöglichte es, besser zwischen den verschiedenen extrazellulären Matrixkomponenten zu differenzieren. Zellkerne und elastische Fasern färben sich in dieser Färbung lila-schwarz, Zytoplasma rötlich-rosa, Kollagenfasern gelb, Glykosaminoglykane blau, Knorpelgewebe grün-blau und Muskelfasern dunkelrot. Analog zum Vorgehen bei der HE-Färbung wurden wieder 6 µm-Schnitte aller Subregionen verwendet.

Movat Pentachrom-Protokoll:

1. Fixierung mit 4% Paraformaldehyd für 10 min.
2. Kryoschnitte 5 min in Aqua bidest. waschen.
3. Auf 55°C erhitzte Bouinsche Lösung, 10 min.
4. Unter fließendem, kalten Leitungswasser spülen, 10 min.
5. 5% Natriumthiosulfat, 5 min.
6. Drei Mal in Aqua bidest. waschen, 2 min, 2 min und 1 min.
7. 1% Alcianblau, 20 min.
8. Unter fließendem, kalten Leitungswasser spülen, 3 min.
9. In erhitztem alkalischen Alkohol stabilisieren, 10 min.
10. Unter fließendem, kalten Leitungswasser spülen, 3 min.
11. Weigerts Eisenhämatoxylin-Lösung, 9 min.
12. Unter fließendem, kalten Leitungswasser spülen, 1 min.
13. Drei Mal in Aqua bidest. waschen, 2 min, 2 min und 1 min.
14. Brilliant Crocein-Säurefuchsin, 1 min.
15. Drei Mal in Aqua bidest. waschen, 2 min, 2 min und 1 min.
16. 5% Phosphorwolframsäure, 5 min.
17. 1% Eisessig, 5 min.
18. Drei Mal in Aqua bidest. waschen, 2 min, 2 min und 1 min.
19. Aufsteigende Alkoholreihe: 96% Ethanol, 2 Mal 100% Ethanol, je 1 min.
20. Alkoholischer Safran, 8 min.
21. 100% Ethanol, 1 min.
22. 100% Xylol, 3 Mal 5 min.
23. Eindecken mit Histo Kitt Eindeckmedium.
24. Objektträger über Nacht bei 37°C lagern.

2.2.9.5 Postoperative Kontrolle der FN-Beschichtung

Zur Kontrolle der Persistenz der FN-Beschichtung nach Reexplantation der Konduits wurden die Präparate an den vier jeweiligen Explantationstagen, analog zu dem unter 2.2.5 beschriebenen Vorgehen, nach fluoreszierenden Signalen des Alexa488-konjugierten FN (FN488) abgesucht und dokumentiert.

2.2.9.6 Immunhistologie

Neben den klassischen histologischen Färbungen haben wir, um eine weitere Differenzierung des Gewebes zu ermöglichen, auch immunhistologische Methoden verwendet. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden 4 µm-Schnitte aller Subregionen genutzt. Die Objektträger wurden mit 4% Paraformaldehyd 10 min lang fixiert. Die Blockierung erfolgte mit 5% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS. Als Primärantikörper fanden anti-von-Willebrand-Faktor (vWF, 1:200, Kaninchen), anti-*alpha-smooth muscle actin* (aSMA, 1:200, Maus), anti-CD3 (1:200, Kaninchen), anti-CD68 (1:200, Maus), anti-Syndecan-3 (1:100, Kaninchen), anti-Vimentin (1:10, Maus) sowie anti-Desmin (1:200, Maus) in PBS + 0,8% BSA bei 37°C über 60 Minuten Verwendung. Die verwendeten Sekundärantikörper gegen Kaninchen- bzw. Mausantikörper waren an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt – Alexa488 (grün, 1:200) und Alexa546 (rot, 1:200). Die Inkubation erfolgte 45 Minuten lang bei 37°C in einer dunklen Feuchtkammer. Anschließend wurden die Zellkerne mit einem Eindeckmedium, welches Diamidinophenylindol (DAPI) enthielt, gegengefärbt und die Deckplättchen mithilfe von Nagellack fixiert.

Protokoll der indirekten Immunfluoreszenz:

1. Umranden der Schnitte auf dem Objektträger mit einem hydrophoben Stift.
2. Fixierung mit 4% Paraformaldehyd für 10 min.
3. 5 min trocknen lassen.
4. 3 Mal 5 min in PBS waschen.
5. 0,25% Triton X-100 in PBS, 10 min.
6. 3 Mal 5 min in PBS waschen.
7. Blockieren mit 5% BSA in PBS in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur, 60 min.
8. 3 Mal 5 min in PBS mit 0,1% Tween waschen.
9. Primärantikörper in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubieren, 60 min.
10. 3 Mal 5 min in PBS mit 0,1% Tween waschen.
11. Sekundärantikörper in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubieren, 45 min.
12. 3 Mal 5 min in PBS waschen.
13. Eindeckmedium mit DAPI auf die trockenen Objektträger tropfen.
14. Versiegeln mit Nagellack.

Aus allen Tieren wurden Objektträger aus repräsentativen Stellen aller Subregionen, analog zu dem Vorgehen bei der HE-Färbung, immunhistologischen Färbungen unterzogen um *Remodelling*-Vorgänge des Bindegewebes und eventuelle zelluläre Veränderungen in den Konduits charakterisieren zu können. Die Bilder wurden unter standardisierten Bedingungen unter einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Als sekundären Antikörper haben wir je nach Bedarf Alexa488 (grün; anti-Kaninchen und anti-Maus) sowie Alexa546 (rot; anti-Kaninchen und anti-Maus) gewählt. Für die FN-Gruppe haben wir ausschließlich Einzelfärbungen mit Alexa546 anti-Maus bzw. anti-Kaninchen durchgeführt um falsch-positive Signale durch das konjugierte FN auszuschließen.

2.2.9.7 In situ-Enzymographie

Die *in situ*-Enzymographie ist ein Verfahren, welches es erlaubt, die Aktivität der Matrix-Metalloproteasen (MMP) im Gewebe *in vitro* darzustellen. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde die fluoreszierende Gelatine 1:100 mit der TRIS-Pufferlösung verdünnt. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden zwei weitere Lösungen als Negativkontrollen angesetzt; zum einen wurde 0,5 M EDTA (Titriplex II) als Inhibitor der MMP zur Arbeitslösung hinzugesetzt, zum anderen wurde die TRIS-Pufferlösung ohne Gelatine auf die Präparate aufgetragen. In einem abgedunkelten Raum wurden 100 µl Arbeits- bzw. Kontrolllösung auf die Präparate pipettiert. Es folgte die Inkubation in einer Feuchtkammer über 24 h bei 37°. Im Anschluss wurden die Objektträger in einer PBS-Lösung abgewaschen, kurz angetrocknet und zum Schluss in Eindeckmedium mit DAPI eingedeckt.

2.2.10 Quantitative Auswertung

Die durchgeführten Färbungen dienten zum einen dazu eine Übersicht der morphologischen Veränderungen der Konduits zu erhalten, zum anderen konnten wir aus den gefärbten Objektträgern Daten erheben um quantitative Aussagen zur zellulären Wiederbesiedlung der Gewebe treffen zu können. Quantitativ ausgewertet haben wir die prozentual besiedelte luminale Fläche der Konduits, das Verhältnis zwischen Dicke der *Tunica intima* und *media*, das Ausmaß der Mineralsalzeinlagerung im Präparat, die absolute Anzahl neu eingewanderter Zellen in der *Tunica media* sowie die Aktivität der MMP im Gewebe.

2.2.10.1 Quantifizierung der Neointima

Um eine repräsentative Beurteilung der Intimadicke vornehmen zu können, wurde in jedem Konduit die Dicke der neu gewachsenen Neointima an insgesamt 99 verschiedenen Stellen gemessen. Dafür wurden aus jeder Subregion (A1, A2, B1, B2) jeweils drei HE-gefärbte Objektträger benutzt, die im Abstand von 200 µm zueinander angefertigt worden waren (siehe Abb. 3). In diesen drei Querschnitten wurde anschließend in acht zirkulär nebeneinander angeordneten Segmenten der Konduitwand die Dicke der neugeformten Neointima sowie auch der *Tunica media* ausgemessen, wobei auf Höhe der Aortenklappe (Subregion A1) die Messpunkte leicht modifiziert wurden (siehe Abb. 4 und Abb. 5). Daraus errechnete sich für die vier Subregionen jedes Konduits ein Intima-Media-Verhältnis welches unter den Gruppen verglichen werden konnte.

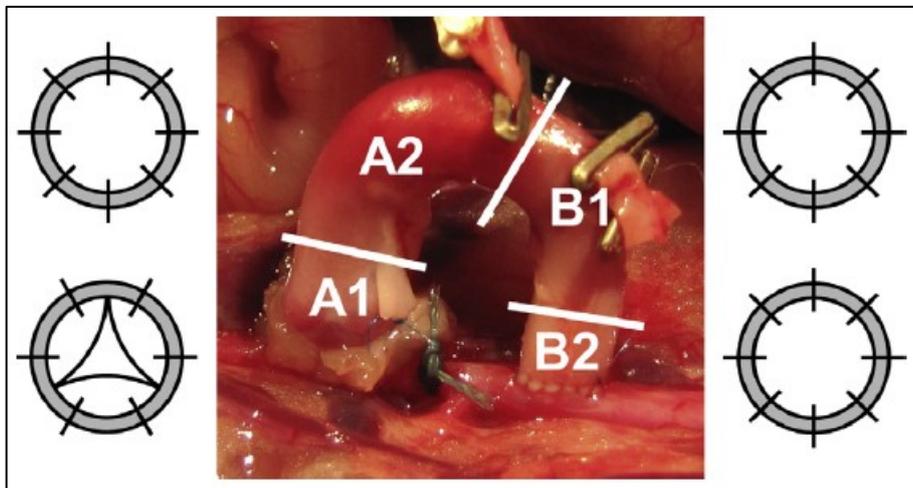


Abbildung 4 – Intraoperatives Bild eines implantierten Konduits mit schematischer Darstellung der Messpunkte für die histologische Auswertung. In A2, B1 und B2 wurde in jedem Präparat an 8 zirkulär gelegenen Stellen die Neointima und die *Tunica media* ausgemessen. Das Verfahren wurde in der Region A1 auf Höhe der Aortenklappen leicht modifiziert: hier wurden an 6 Stellen im Lumen sowie zusätzlich an den 3 Klappenkommissuren Messungen durchgeführt. (Quelle: Assmann et al., 2013)

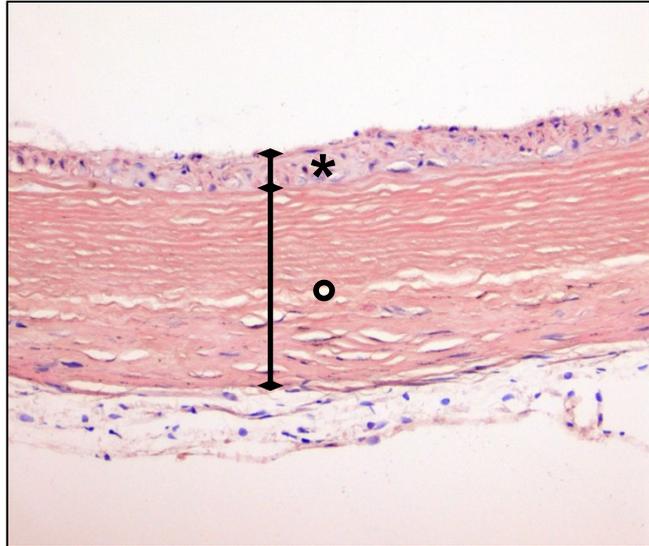


Abbildung 5 - Exemplarische Ausmessung der Neointima (markiert mit Stern) und *Tunica media* (markiert mit Kreis) in einem HE-gefärbten Präparat. 20x Vergrößerung, das Lumen befindet sich oben im Bild.

Neben der durchschnittlichen Intima- und Mediadicke wurde auch der prozentuale Anteil der luminalen Wiederbesiedlung zu den verschiedenen Zeitpunkten ausgewertet. Dafür wurde analog zu der oben beschriebenen Methodik dokumentiert, wie viele der acht ausgemessenen Stellen nach einem, 7, 28 und 56 Tagen *in vivo* überhaupt eine messbare Neointima aufwiesen und daraus der prozentuale Anteil am Gesamtlumen berechnet.

2.2.10.2 Quantifizierung der Verkalkung

Für die angefertigten von Kossa-Schnitte wurde ein Verkalkungsscore entwickelt, um das Ausmaß der Kalzifizierung zu objektivieren (siehe Abb. 6). Für jedes Konduit wurde in allen vier Subregionen jeweils ein repräsentativer, zentral gelegener Querschnitt durch die Aorta betrachtet. Der Querschnitt wurde in 4 Quadranten unterteilt und jeder Quadrant wurde nach einem standardisierten Kalkscore wie folgt bewertet: wenn in der 10-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops in der von Kossa-Färbung kein eindeutiger Calciumnachweis zu sehen war, wurde der Quadrant mit 0 Punkten bewertet, falls fleckige Mikroverkalkungen vorhanden waren mit 1 Punkt. Plaquetförmige Kalkschollen, die weniger als 50% des Quadranten ausfüllten, wurden mit 2 Punkten bewertet und ausgeprägte Kalkschollen größer als 50% mit 3 Punkten. Die Summe der vier erhobenen Werte bildete den Kalkscore für die jeweilige Subregion, sodass ein Wert zwischen 0 und 12 Punkten erreicht werden konnte.

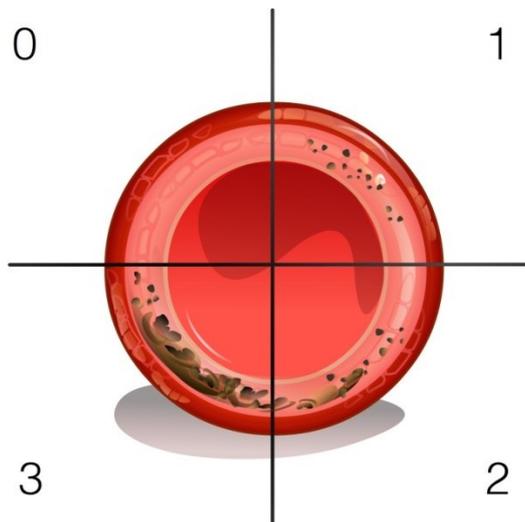


Abbildung 6 - Schematische Übersicht des Kalzifizierungsscores. Jeder Quadrant wurde separat mit 0-3 Punkten bewertet und daraus anschließend die Summe gebildet. Somit konnte jede Subregion insgesamt einen Kalkscore von 0-12 Punkten erreichen.

2.2.10.3 Quantifizierung der zellulären Wiederbesiedlung

Um eine mögliche Wiederbesiedlung der dezellularisierten *Tunica media* in den 4- und 8-Wochen Tieren quantifizieren zu können, haben wir die absolute Anzahl an Zellen in der *Tunica media* bestimmt. Analog zum Vorgehen bei der HE-Färbung wurden aus allen 4 Subregionen der Konduits erneut jeweils drei HE-gefärbte Objektträger untersucht. Es wurde unter dem Lichtmikroskop im gesamten Querschnitt des Konduits die absolute Anzahl an sichtbaren intakten Zellkernen zwischen den elastischen Fasern der *Tunica media* manuell ausgezählt.

2.2.10.4 Quantifizierung der MMP-Aktivität

Nach durchgeführter *in situ*-Enzymographie wurde in den Subregionen A1, A2, B1 und B2 an jeweils vier Stellen die MMP-Aktivität mit der Bildauswertungssoftware *ImageJ* bestimmt. Verwendet wurden dafür Schnitte der 4- sowie 8-Wochen-Gruppen. In den jeweiligen Aufnahmen wurde die zu untersuchende Region manuell umfahren und die Signalintensität pro Fläche mithilfe der Bildauswertungssoftware bestimmt. Anschließend wurden die Tiere und Gruppen untereinander verglichen.

2.2.11 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Für die *polymerase chain reaction* (PCR)-Analysen wurden jeweils 6 Tiere aus Kontroll- und FN-Gruppe verwendet. Die Konduits wurden nach 56 Tagen explantiert, wie unter 2.2.8 beschrieben präpariert und bei -80°C gelagert. Für unsere Versuche haben wir die qRT-PCR gewählt. Die relative Genexpression beider Versuchsgruppen wurde mithilfe der ddCt-Methode miteinander verglichen. Eine vollständige Liste der verwendeten Primer kann unter 2.1.3 eingesehen werden.

2.2.11.1 Isolation der Ribonukleinsäure

Die Aortenkonduits wurden zunächst unter permanenter Kühlung durch flüssigen Stickstoff manuell zerkleinert. Anschließend wurden die Präparate in 1 ml Trizol-haltiger Lösung 1 min bei Raumtemperatur homogenisiert. Null Komma zwei ml Chloroform wurden dazu gemischt und die Probe geschüttelt, bis sich beide Lösungen vermischt hatten. Anschließend wurde die Lösung bei 1100 Umdrehungen pro Minute und 6°C 15 Minuten lang zentrifugiert. Daraus resultierend setzte sich auf dem Boden des Röhrchens eine feste Masse ab und in der oberen Hälfte eine wässrige Phase. Diese wässrige Lösung wurde in ein frisches Proberöhrchen überführt und 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine weitere Zentrifugation bei 1100 Umdrehungen pro Minute und 6°C für 10 Minuten. Der wässrige Überstand wurde danach abgeschüttet und das am Boden des Proberöhrchens entstandene Pellet mit 1 ml Ethanol gewaschen. Es folgte erneut eine Zentrifugation bei 8600 Umdrehungen pro Minute und 6°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde wieder abgeschüttet und das Pellet in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Mithilfe des *RNeasy Kits* von Qiagen erfolgte im Anschluss nach Herstellerangaben die weitere Aufreinigung der Ribonukleinsäure (RNA), die Entfernung des Trizols sowie die DNase-Behandlung.

Die gewonnene RNA wurde folgenden Qualitätskontrollen unterzogen: durch Photospektrometrie wurden die optischen Dichtewerte bei einer Wellenlänge von 230, 260 und 280 nm bestimmt, um die Reinheit und Quantität der isolierten Boten-RNA (mRNA) zu ermitteln. Zur Kontrolle der RNA-Degradation wurde ein kleiner Teil der gewonnen mRNA mit dem *Agilent Kit* überprüft.

2.2.11.2 Herstellung der komplementären DNA

Da die gewonnene mRNA bei der PCR nicht amplifiziert werden würde, musste sie zunächst mithilfe der so genannten reversen Transkriptase in Komplement-DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die unter 2.2.11.1 gewonnenen Proben wurden mithilfe des *QuantiTect Reverse Transcription Kits* von Qiagen nach Herstellerangaben weiterverarbeitet und anschließend bis zur Durchführung der PCR bei -80°C gelagert.

2.2.11.3 Durchführung der PCR

Die qRT-PCR wurde auf einer 96-Loch-Platte mithilfe eines PCR-Thermozyklers durchgeführt. Die benötigte DNA-Polymerase sowie der grün-fluoreszierende Farbstoff zur Echtzeit-Darstellung der Amplifikation entstammten dem *Platinum SYBR Green PCR Master Mix* von Invitrogen. Bei einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurde das folgende Protokoll gewählt: 50°C für 2 Minuten, 95°C für 2 Minuten, 96°C für 15 Sekunden gefolgt von 60°C für 30 Sekunden. Diese Schritte wurden für insgesamt 40 Zyklen wiederholt. Anschließend folgten 95°C für 15 Sekunden, 60°C für 1 Minute, 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 15 Sekunden. Zur Kontrolle der PCR-Ergebnisse wurde beta-Aktin als *housekeeping*-Gen gewählt. Die Ergebnisse der Primeramplifikation wurden zunächst mit der beta-Aktin-Expression normalisiert (dCT-Methode). Dieses Ergebnis wurde wiederum in Verhältnis gesetzt zu dem durchschnittlichen dCT-Wert des entsprechenden Gens der Kontrollgruppe (ddCt-Methode). Die daraus resultierende relative Genexpression wurde dann statistisch miteinander verglichen.

2.2.12 Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Die statistische Auswertung fand mit *GraphPad Prism* Version 5.04 statt. Je nach Bedarf wurden Student-t-Tests, Mann-Whitney-U-Tests oder Zwei-Wege-ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Tests angewendet. Ein signifikantes Ergebnis wurde angenommen bei p-Werten kleiner als 0,05.

3. Ergebnisse

3.1 Operatives Outcome

Die durchschnittliche Schnitt-Naht-Zeit bei Implantation der Konduits betrug in der FN-Gruppe $85,6 \pm 3,66$ Minuten und $86,5 \pm 4,75$ Minuten in der Kontrollgruppe ($p = 0,879$). Dabei wurde die infrarenale Aorta in der FN-Gruppe $20,7 \pm 0,80$ Minuten beziehungsweise $21,8 \pm 1,25$ Minuten in der Kontrollgruppe abgeklemmt. Unmittelbar nach der Implantation des dezellularisierten Konduits, sowie kurz vor der Reexplantation, wurde der Blutfluss über das implantierte Gefäßkonduit mithilfe von Doppler-Sonographie kontrolliert. Bei allen Tieren wurde ein hämodynamisch regelrechter Blutfluss ausschließlich über das Konduit nachgewiesen. Alle Empfängerratten haben ohne klinische oder sonografische Zeichen einer Malperfusion der unteren Extremitäten bis zum entsprechenden Explantationstag überlebt. Bei den 8-Wochen Tieren ($n = 3$ pro Gruppe) hatte das Körpergewicht von $223,1 \pm 5,19$ g auf $358,3 \pm 9,54$ g für die FN-Gruppe, sowie $223,2 \pm 3,93$ g auf $342,2 \pm 8,82$ g für die Kontrollgruppe, zugenommen ($p = 0,226$). Im Rahmen der Vorversuche für diese Arbeit haben wir zudem an zwei Ratten durch Plastination des Gefäßsystems der Blutfluss über das Konduit nach 8 Wochen *in vivo* dargestellt (siehe Abb. 7).



Abbildung 7 - Fotografie eines infrarenal implantierten Konduits nach Plastination (Pfeil = implantiertes Konduit; Stern = native *Aorta abdominalis*; Doppelstern = plastinierte Kapillargefäße der rechten Niere). Das plastinierte Lumen des Gefäßkonduits stellt sich nach 8 Wochen *in vivo* regelrecht dar ohne Hinweis auf eine relevante Stenosierung.

3.2 Bewertung der Dezellularisierung

Die Wirksamkeit des Detergenzien-basierten Dezellularisierungsprotokolls, welches wir verwendeten, ist in einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe an bovinen Herzklappen nachgewiesen worden (Tschierschke, 2010) und fand im Rahmen der Modelletablierung im Vorfeld dieser Arbeit auch schon an Ratten Verwendung (Assmann et al., 2012). Demnach führte das Protokoll zu einer nahezu vollständigen Dezellularisierung des Gewebes bei gut erhaltener extrazellulärer Matrix und Basallamina. In Toxizitätstests wurde gezeigt, dass sich das Protokoll für *in vivo*-Wiederbesiedlungsversuche eignet. Um in dieser Arbeit die Effektivität des Detergenzien-basierten Protokolls bei Ratten-Konduits zu ermitteln, haben wir im Rahmen der Vorversuche HE-Färbungen von dezellularisierten Rattenaorten angefertigt (siehe Abb. 8). Es zeigten sich lediglich vereinzelte Zellkerne, bevorzugt in Regionen mit hoher Wanddicke. Der Großteil des Präparats präsentierte sich vollständig zellfrei.

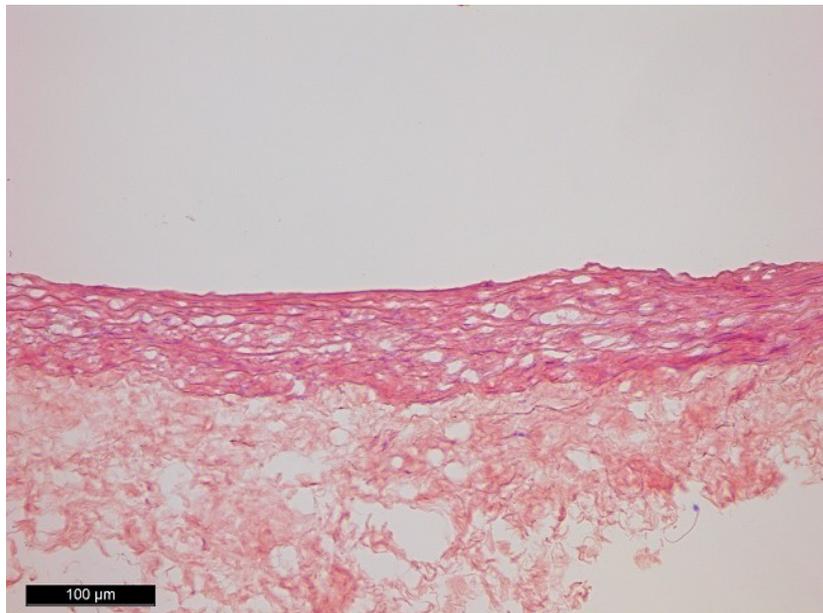


Abbildung 8 - HE-Färbung eines repräsentativen Querschnitts einer dezellularisierten Rattenaorta in 20x Vergrößerung. Das Lumen befindet sich oben im Bild. Es kommen keine intakten Zellkerne zur Darstellung.

Ebenso haben wir die frisch dezellularisierten Konduits mit DAPI gefärbt, um unter dem Fluoreszenzmikroskop eventuelle DNA-Reste darzustellen. Im Vergleich zu einer nativen Aorta war im dezellularisierten Konduit nur wenig DAPI-Signal nachweisbar, intakte Zellkerne kamen nicht zur Darstellung.

3.3 Persistenz der Fibronektin-Beschichtung

Unmittelbar vor der Implantation eines mit FN beschichteten Konduits wurden 6 μ m-Schnitte angefertigt und unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert (siehe Abb. 9). Bei allen implantierten Konduits zeigte sich präoperativ eine gleichmäßige luminale sowie adventitielle Beschichtung mit grün-fluoreszierendem FN.

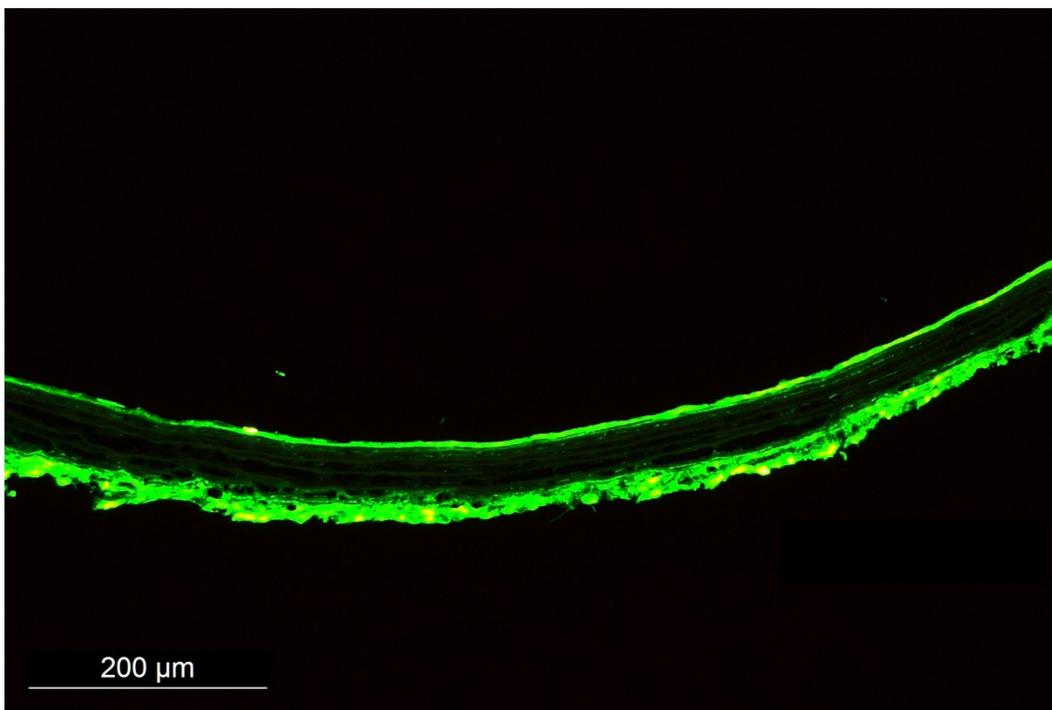


Abbildung 9 – Repräsentativer Querschnitt durch eine dezellularisierte und mit FN beschichtete Aortenwand unmittelbar vor Implantation in 10x Vergrößerung. Das Lumen befindet sich oben im Bild. Unter Fluoreszenzanregung erscheint das Alexa488-konjugierte FN in der *Tunica adventitia* sowie im Lumen des Konduits grün.

Um auch nach Explantation am Ende des Observationszeitraums die Persistenz des FN nachweisen zu können, wurden die Präparate erneut fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Es zeigte sich nach einem und 7 Tagen ein deutliches Signal auf beiden Oberflächen. Selbst nach 4 und 8 Wochen *in vivo* konnten wir immer noch ein positives Alexa488-Signal nachweisen, die Intensität hatte jedoch deutlich abgenommen (siehe Abb. 10).

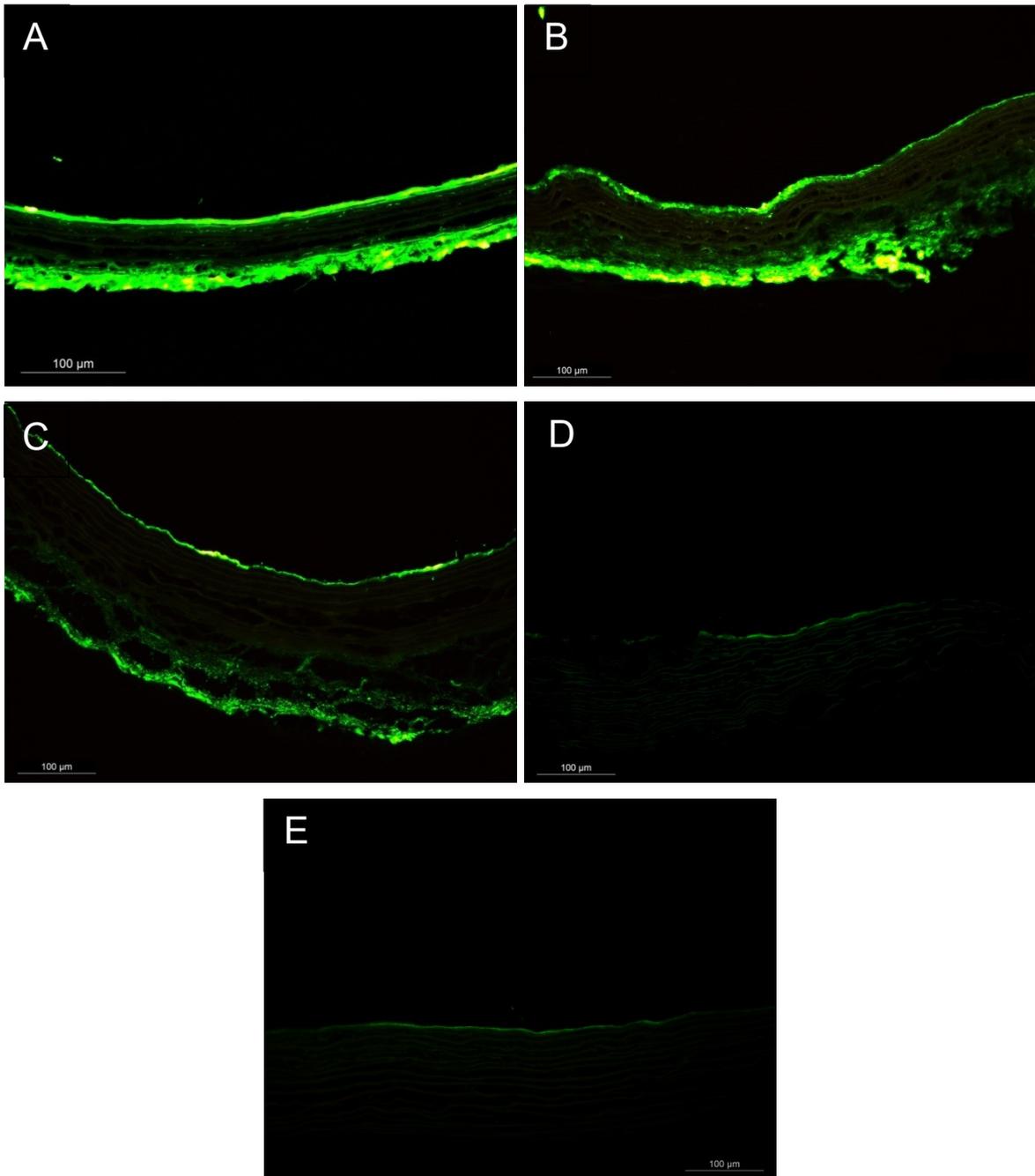


Abbildung 10 – Repräsentative Querschnitte durch FN-beschichtete Aortenkonduits: (A) unmittelbar vor Implantation, (B) nach einem Tag *in vivo*, (C) nach 7 Tagen *in vivo*, (D) nach 28 Tagen *in vivo* sowie (E) nach 56 Tagen *in vivo*. 20x Vergrößerung, das Lumen befindet sich oben im Bild. Die präoperative Kontrolle (A) zeigt ein deutliches luminales sowie adventitielles Signal für das Alexa488-konjugierte FN (grün). Die Signalintensität nimmt im zeitlichen Verlauf ab, dennoch konnten wir selbst nach 8 Wochen *in vivo* eine Persistenz des FN nachweisen (E). (Bild B, C, D, E - Quelle: Assmann et al., 2013)

3.4 Histologische Auswertung

3.4.1 Qualitative und quantitative Auswertung der Neointima

In den durchgeführten histologischen und immunhistologischen Färbungen zeigten sich zu den ersten beiden Untersuchungszeitpunkten nach einem bzw. 7 Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe (siehe Abb. 11). Die Subregionen aller Tiere imponierten durch eine nahezu zellfreie *Tunica media*, die stellenweise leicht aufgetrieben wirkte. Die luminale Fläche der Konduits verblieb zunächst unbesiedelt, während sich im Bereich der *Tunica adventitia* schon nach 24 h erste basophile Zellkerne nachweisen ließen. Diese adventitielle Besiedlung war auch nach 7 Tagen *in vivo* weiter progredient.

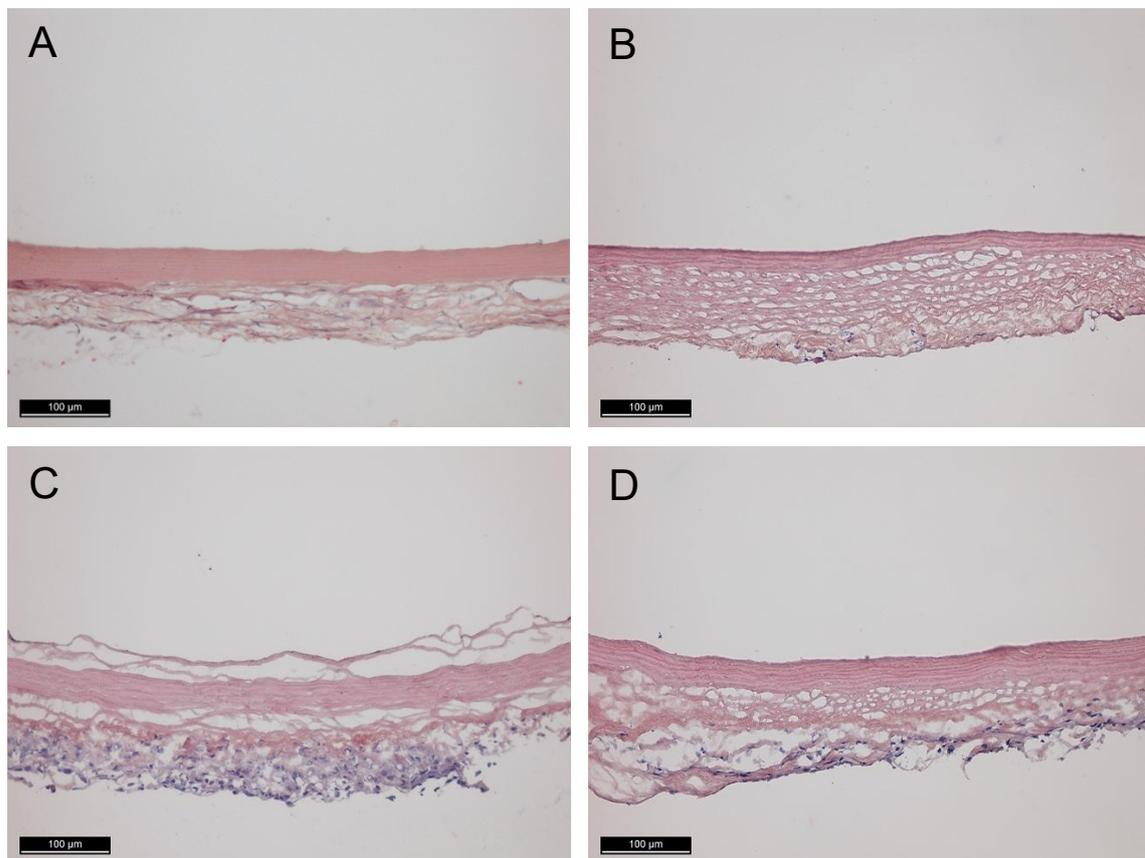


Abbildung 11 – HE-gefärbte, repräsentative Querschnitte explantierter Konduits in 20x Vergrößerung. Das Lumen befindet sich oben im Bild. Bild A (FN-Gruppe) und B (Kontrollgruppe) wurden nach einem Tag *in vivo* angefertigt. Nach 7 Tagen *in vivo* zeigte sich eine zunehmende zelluläre Besiedlung der *Tunica adventitia*, jedoch ohne wesentliche Unterschiede zwischen FN- (C) und Kontrollgruppe (D). Die Formation einer durchgängigen Neointima war zu diesem Zeitpunkt nicht zu erkennen. Die *Tunica media* präsentiert sich frei von Zellen. Zu diesem Zeitpunkt ergaben sich ebenso keine regionalen Unterschiede zwischen den verschiedenen Subregionen.

Nach 4 Wochen *in vivo* veränderte sich das histologische Bild der Implantate jedoch deutlich. Die adventitielle Fläche war nun von allen Seiten mit Empfängerzellen bewachsen und zum ersten Mal zeigte sich auch im Lumen der implantierten Konduits eine Ansiedlung von länglichen Zellkernen, welche morphologisch dem einschichtigen Endothel einer nativen Aorta ähnelten (siehe Abb. 12A und B).

Neben dieser einschichtigen Neointima zeigten sich nach 4 Wochen *in vivo* ebenso Areale mit einer mehrschichtigen, hyperplastischen *Tunica intima*. Multiple Lagen länglicher Zellkerne wurden vor allem in den anastomosennahen Regionen der Aortenkonzduits (Subregion A1 und B2) dokumentiert (siehe Abb. 12 und 13). Augenscheinlich wirkte diese Neointimahyperplasie in den Tieren der FN-Gruppe ausgeprägter, was die quantitative Auswertung später belegt hat.

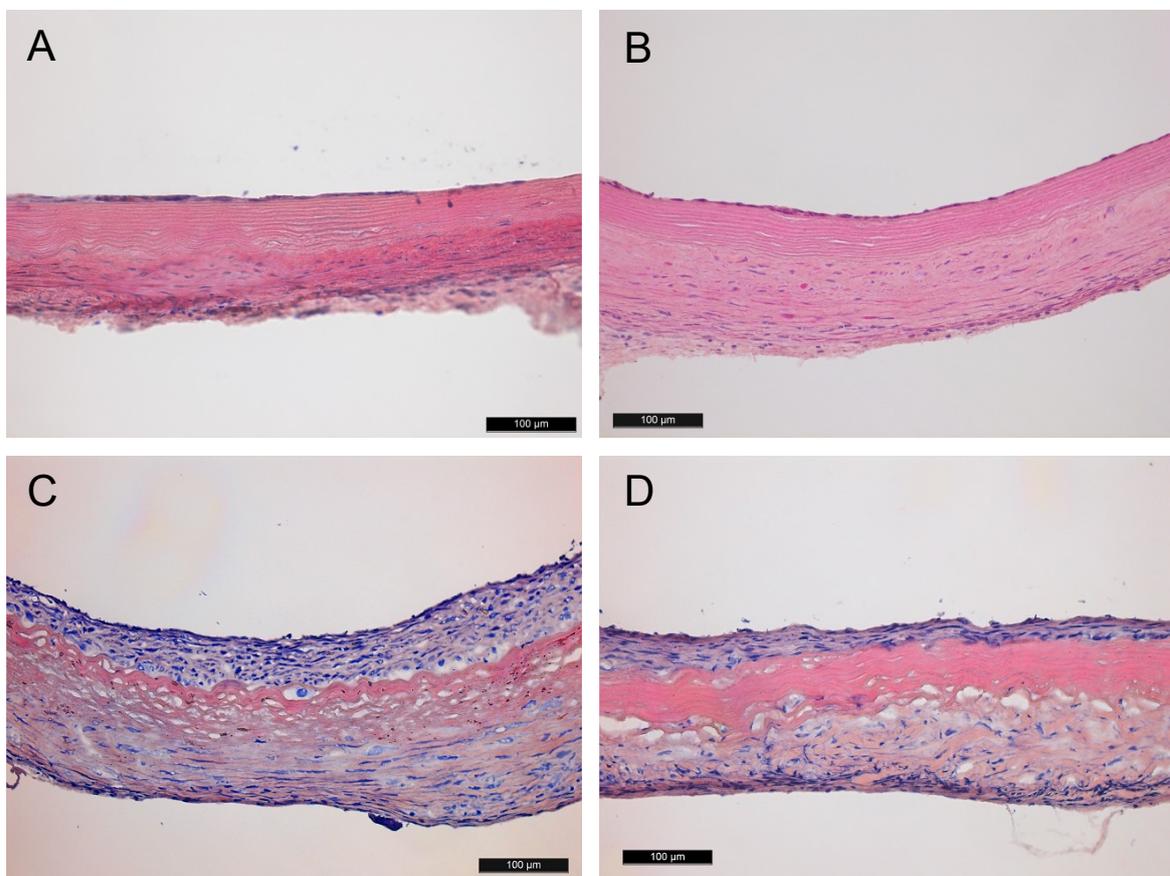


Abbildung 12 - HE-gefärbte, repräsentative Querschnitte explantierter Konduits nach 4 Wochen *in vivo*. 20x Vergrößerung, das Lumen befindet sich oben im Bild. Die Bilder A und C zeigen Tiere der FN-Gruppe, B und D Tiere der Kontrollgruppe. Nach 4 Wochen waren in beiden Gruppen Teile des Lumens mit einer einschichtigen, endothelähnlichen Zellschicht ausgekleidet (A, B). Betont in den anastomosennahen Subregionen (A1 und B2) zeigten sich jedoch auch erste Hinweise auf eine Neointimahyperplasie (C, D). (Bild A - Quelle: Assmann et al., 2013)

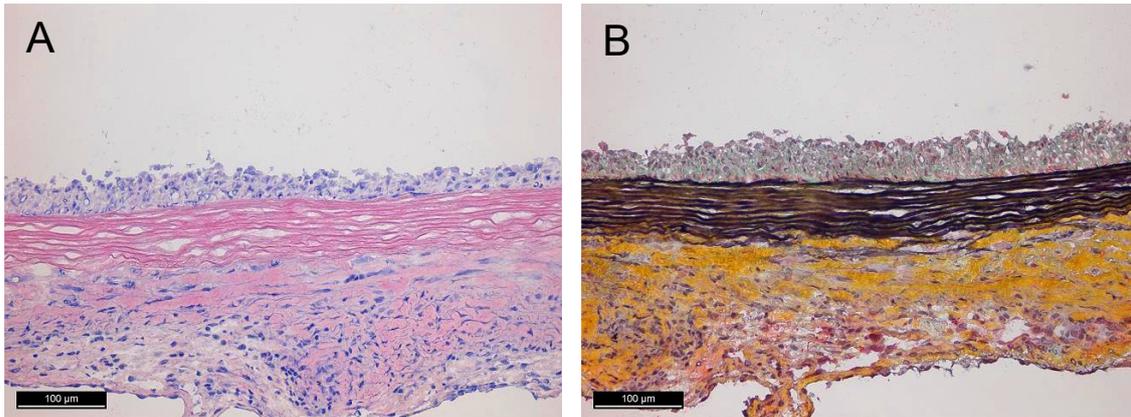


Abbildung 13 – Bild A zeigt eine HE-Färbung, durchgeführt an einem Tier aus der Kontrollgruppe nach 4 Wochen *in vivo*. 20x Vergrößerung, das Lumen befindet sich oben im Bild. Korrelierend dazu ist auf Bild B eine Movat Pentachrom-Färbung aus demselben Tier zu sehen. Der gelbe Farbstoff in Bild B kennzeichnet die Kollagenfasern der *Tunica adventitia*. Die *Tunica media* blieb zu diesem Zeitpunkt weiterhin zellfrei, lediglich die elastischen Fasern kamen zur Darstellung (schwarz).

Histologisch zeigte sich nach 8 Wochen ein Progress sowohl der adventitiellen Besiedlung, vor allem aber der Neointimahyperplasie, betont in den anastomosennahen Subregionen. In Subregion A1 schienen bei manchen Tieren auch die Kommissuren der Aortenklappe betroffen. Auch zu diesem Zeitpunkt war die Hyperplasie in der FN-Gruppe augenscheinlich stärker ausgeprägt. Um dieses Ergebnis auch quantitativ belegen zu können, haben wir gefärbte Präparate verwendet um verschiedene Parameter zu bestimmen und zwischen den Gruppen zu vergleichen. Zunächst wurde die prozentual wiederbesiedelte Fläche des Gefäßlumens analysiert (siehe 2.2.10.1).

Um auch lokale Unterschiede aufzudecken, wurden die verschiedenen Subregionen einzeln ausgewertet. Vor allem die anastomosenernen Subregionen (A2 und B1) zeigten dabei eine signifikante Zunahme der prozentual besiedelten luminalen Fläche zwischen Woche 4 und Woche 8 ($p < 0,0001$ in Subregion A2 und $p < 0,01$ in Subregion B1; siehe Abb. 14B). Das Lumen der anastomosennahen Subregionen A1 und B2 hingegen war schon nach 4 Wochen nahezu vollständig mit neuen Zellen bewachsen. Somit konnte zwischen der 4. und 8. Woche keine weitere Zunahme verzeichnet werden (siehe Abb. 14A).

In der Subregion A1, auf Höhe der implantierten Aortenklappe, zeigte sich in der FN-Gruppe schon nach 4 Wochen eine nahezu vollständige luminalen Wiederbesiedlung, welche signifikant beschleunigt war gegenüber der Kontrollgruppe ($98,6 \pm 1,39\%$ zu $77,8 \pm 10,37\%$, $p < 0,05$; siehe Abb. 14A). Nach 8 Wochen war die Subregion A1 in der FN-Gruppe vollständig luminal besiedelt ($100 \pm 0\%$), während die Kontrollgruppe weiterhin unbesiedelte Stellen aufwies ($88,9 \pm 4,39\%$, $p =$ nicht signifikant).

Im proximalen Anteil des Aortenbogens (Subregion A2) war die Rebesiedlung nach 4 Wochen insgesamt schwächer ausgeprägt und gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant beschleunigt, es zeigte sich lediglich ein Trend Richtung FN-Gruppe ($22,2 \pm 8,78\%$ in der FN-Gruppe im Vergleich zu $6,9 \pm 4,71\%$ in der Kontrollgruppe, $p =$ nicht signifikant; siehe Abb. 14B). Durch das rasche Fortschreiten der Neointimabildung nahm dieser Trend weiter zu und war nach 8 Wochen statistisch signifikant ($81,9 \pm 9,34\%$ in der FN-Gruppe und $34,7 \pm 10,58\%$ in der Kontrollgruppe, $p < 0,01$; siehe Abb. 14B). In den weiter distalen Subregionen B1 und B2 waren die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in der besiedelten luminalen Fläche weniger ausgeprägt – hier konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

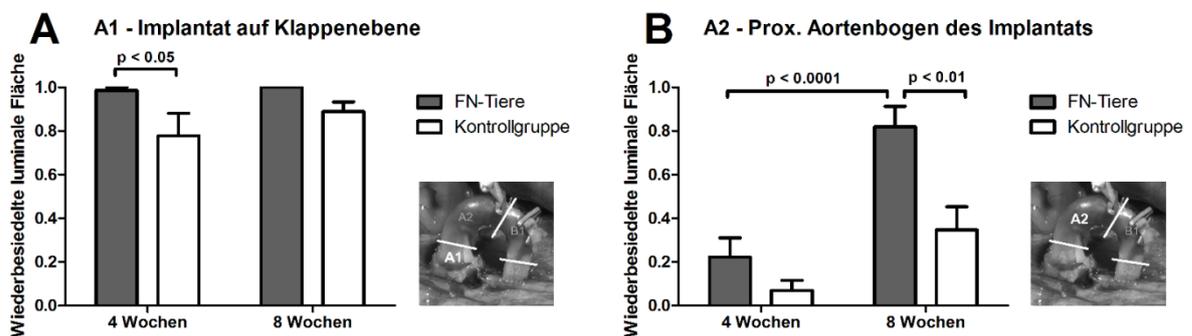


Abbildung 14 – Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Neointima. Bild A zeigt die prozentuale Besiedlung des Lumens beider Versuchsgruppen nach 4 bzw. 8 Wochen in der Subregion A1 auf Höhe Aortenklappe, Bild B die entsprechenden Werte für die Subregion A2 auf Höhe des proximalen Aortenbogens. (Modifiziert aus: Assmann et al., 2013)

Zum Ende des Beobachtungszeitraumes konnten wir nachweisen, dass die luminale Wiederbesiedlung in der FN-Gruppe, unabhängig von dessen Ausmaß, über alle vier Subregionen gemittelt, gegenüber der Kontrollgruppe signifikant beschleunigt war. Insgesamt waren in den vier Subregionen aller Tiere aus der FN-Gruppe nach 8 Wochen $89,9 \pm 5,45\%$ der luminalen Fläche mit Zellen besiedelt gegenüber $73,6 \pm 13,14\%$ in der Kontrollgruppe ($p = 0,006$).

Da die prozentuale Besiedlungsfläche lediglich eine Aussage über die Vollständigkeit der luminalen Reendothelialisierung ermöglicht, wurde in jeder Subregion auch die absolute Dicke der neugeformierten Neointima sowie der *Tunica media* ausgemessen, um auch eine Aussage zum Ausmaß der Neointimahyperplasie treffen zu können. Dafür wurde für jede Subregion das Intima-Media-Verhältnis berechnet und zwischen den beiden Versuchsgruppen verglichen (siehe Abb. 15).

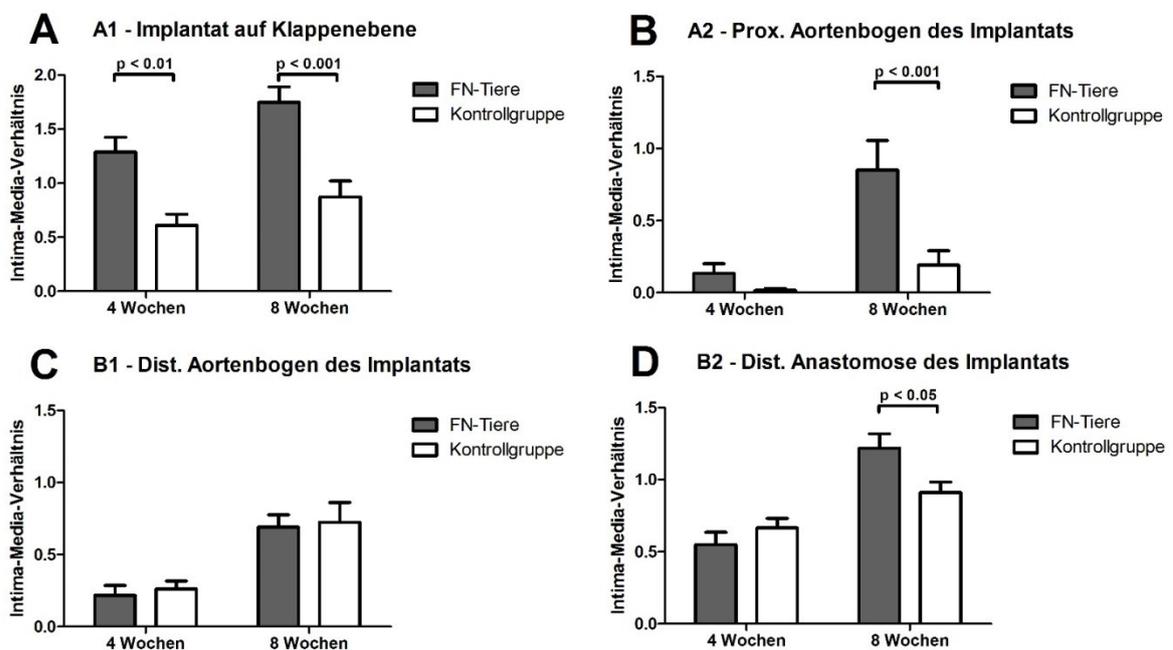


Abbildung 15 – Das Verhältnis von Neointima zur *Tunica media* in den verschiedenen Subregionen nach 4 bzw. 8 Wochen *in vivo*. Nach 8 Wochen ließ sich für alle Subregionen der FN-Gruppe, ausgenommen B1, ein signifikant erhöhtes Intima-Media-Verhältnis gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen. (Übersetzt aus: Assmann et al., 2013)

Nach 4 Wochen *in vivo* schien die ausgemessene Dicke der Neointima für beide Gruppen weitestgehend gleichmäßig, in der anastomosennahen Subregion A1 konnte jedoch schon zu diesem Zeitpunkt ein signifikant erhöhtes Intima-Media-Verhältnis in der FN-Gruppe nachgewiesen werden ($1,3 \pm 0,13$ in der FN-Gruppe gegenüber $0,6 \pm 0,10$ in der Kontrollgruppe, $p < 0,01$; siehe Abb. 15A). Dieser Trend setzte sich auch nach 8 Wochen *in vivo* weiter fort – vor allem in der Subregion A1 nahm das Verhältnis im Laufe der Zeit noch weiter zu ($1,7 \pm 0,14$ in der FN-Gruppe gegenüber $0,9 \pm 0,15$ in der Kontrollgruppe nach 8 Wochen, $p < 0,001$; siehe Abb. 15A). Auch in den Subregionen A2 und B2 war das Intima-Media-Verhältnis zum Ende des Beobachtungszeitraumes in der FN-Gruppe signifikant erhöht (Subregion A2: $0,9 \pm 0,20$ gegenüber $0,2 \pm 0,10$ in der Kontrollgruppe, $p < 0,001$; Subregion B2: $1,2 \pm 0,10$ gegenüber $0,9 \pm 0,07$ in der Kontrollgruppe, $p < 0,05$; siehe Abb. 15B/D). Im absteigenden Teil des Aortenbogens (Subregion B1) konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Auch über alle vier Subregionen gemittelt haben wir gezeigt, dass nach 8 Wochen *in vivo* die FN-beschichtete Versuchsgruppe ein insgesamt signifikant erhöhtes Verhältnis von Neointima zu *Tunica media* aufwies ($1,1 \pm 0,10$ für die FN-Gruppe gegenüber $0,7 \pm 0,07$ in der Kontrollgruppe, $p < 0,0002$).

Während die Ausmessung der Neointima standardisiert an HE-gefärbten Präparaten durchgeführt wurde, haben wir zur weiteren qualitativen Auswertung dieser luminalen Wiederbesiedlung die Präparate auch mittels Immunfluoreszenzverfahren gefärbt. Wir konnten dabei zeigen, dass die meisten Zellen der hypertrophierten Neointima aSMA-positiv waren. Zudem zeigte sich im Lumen eine dünne Bande endothelähnlicher Zellen, welche nach durchgeführter Immunfluoreszenz ein vWF-positives Signal abgaben (siehe Abb. 16 und 17).

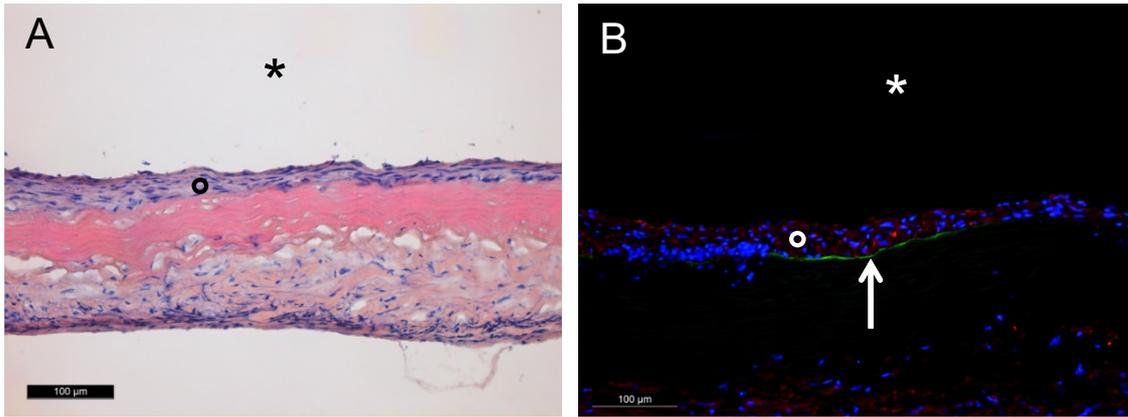


Abbildung 16 – Bild A zeigt die HE-Färbung eines FN-Tieres nach 4 Wochen *in vivo*, während in Bild B dieselbe Subregion nach durchgeführter Immunfluoreszenz dargestellt ist. Beides in 20x Vergrößerung, das Lumen (Stern) befindet sich oben im Bild. Der Kreis markiert die leicht hypertrophe Neointima. Diese zeigt im rechten Bild ein aSMA-positives Signal (rot). Zellkerne erscheinen durch eine Färbung mit DAPI blau, die grüne Bande im Lumen entspricht hier dem Alexa488-konjugierten FN (weißer Pfeil).

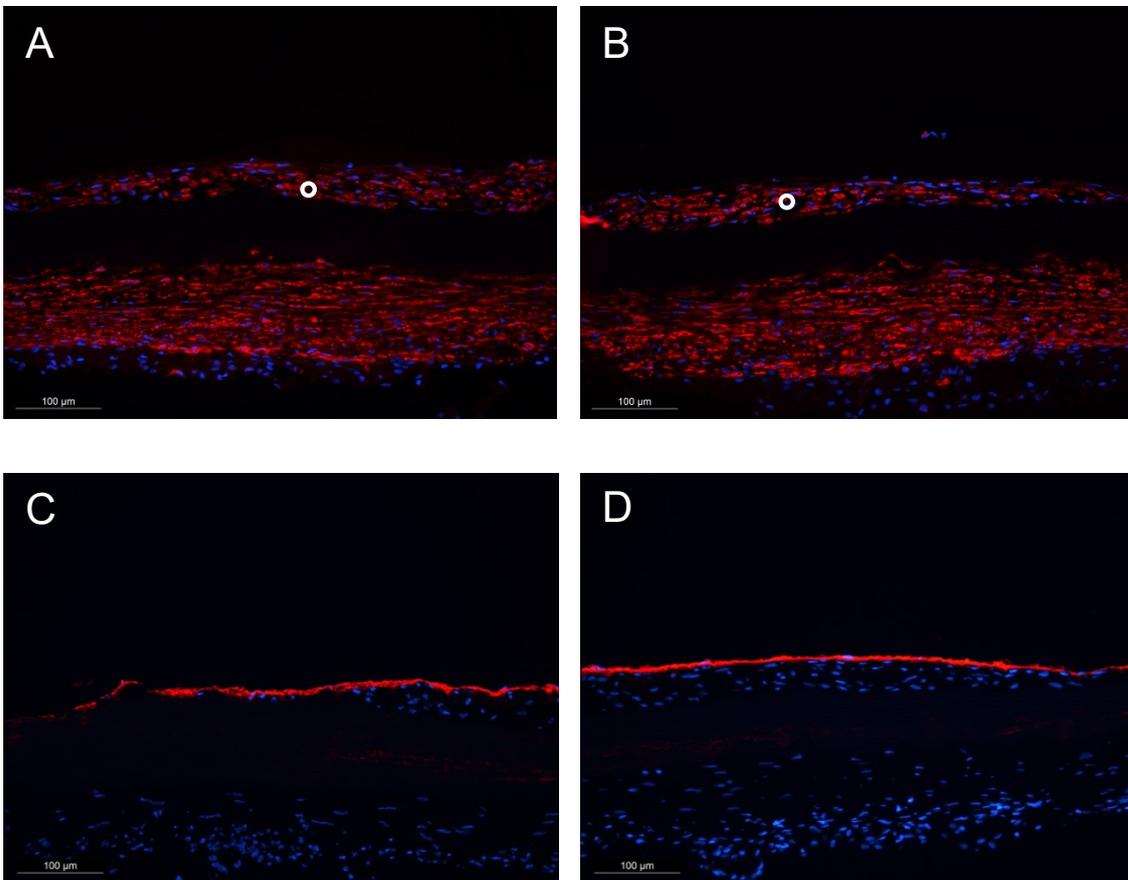


Abbildung 17 – Immunfluoreszenzfärbungen von repräsentativen Querschnitten durch Konduits nach 8 Wochen *in vivo*. Bild A und C zeigen Tiere der FN-Gruppe, B und D Tiere der Kontrollgruppe. 20x Vergrößerung, das Lumen befindet sich oben im Bild. Die oberen beiden Bilder zeigen ein deutlich positives aSMA-Signal in der Neointima, ebenso wie in der *Tunica adventitia* (rot, markiert mit Kreis). In den unteren Bildern kommt ein bandenförmig positives vWF-Signal (rot) zur Darstellung welche das Lumen zirkulär auskleidet. Zellkerne wurden mittels DAPI blau gefärbt. (Bild B, D - Quelle: Assmann et al., 2013)

Ergänzend zu den HE-Färbungen und Immunfluoreszenzen wurden zusätzliche Movat Pentachrom- und von Kossa-Färbungen durchgeführt. Letzteres diente dem Nachweis von Mineralsalzablagerungen im Gewebe zur Beurteilung eventueller Kalzifizierung. Dabei konnten wir zeigen, dass in Arealen mit deutlicher Neointimahyperplasie erste Mineralsalzablagerungen sichtbar wurden, sowohl in der Kontroll- als auch in der FN-Gruppe (siehe Abb. 19). Dabei war gut zu erkennen, dass diese Mikroverkalkungen betont zentral in der hyperplastischen Neointima auftraten. Die Quantifizierung der Verkalkung wurde wie unter 2.2.10.2 beschrieben durchgeführt. Ein Kalkscore wurde verwendet, der von 0 bis maximal 12 Punkten reichte. Nach 8 Wochen *in vivo* zeigte sich zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Verkalkung ($p = 0,35$; siehe Abb. 18).

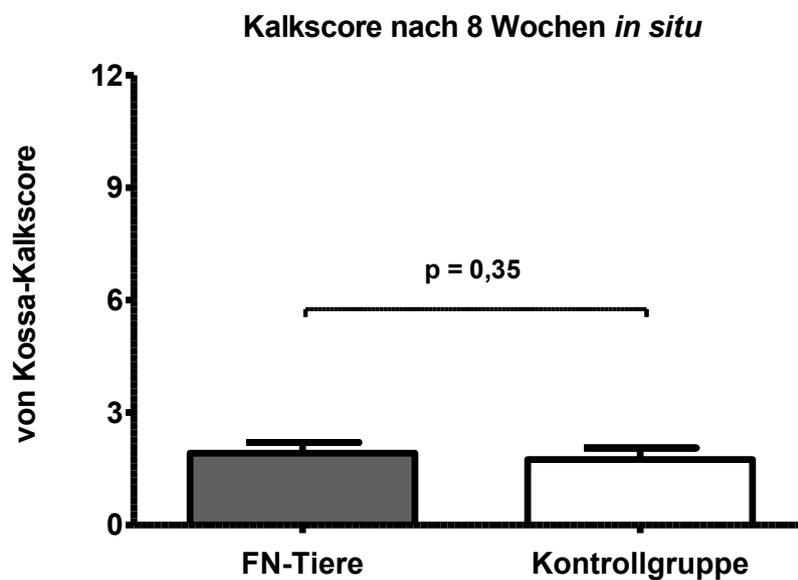


Abbildung 18 – Vergleich der Kalkscores in Versuchs- und Kontrollgruppe nach 8 Wochen *in vivo*. Je nach Grad der Verkalkungen in der von Kossa-Färbung konnten 0-12 Punkte erreicht werden. Es ließ sich dabei kein signifikanter Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe aufdecken.

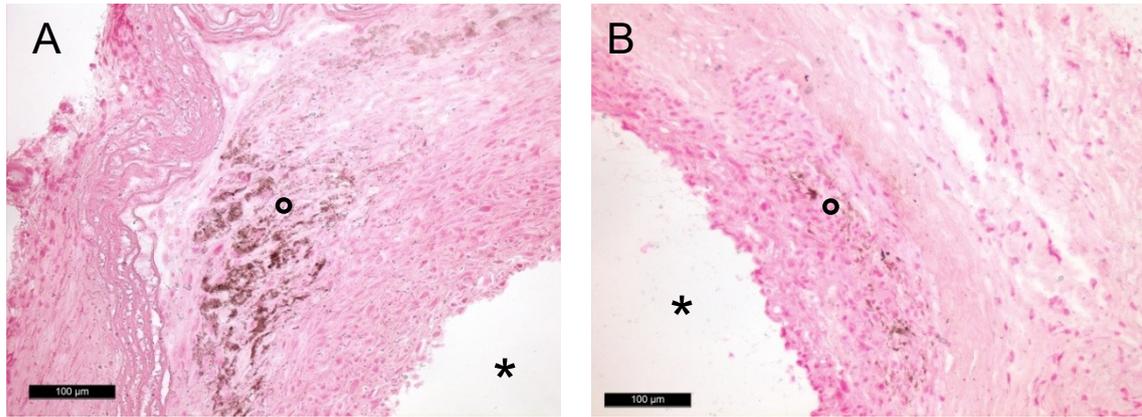


Abbildung 19 – Nachweis von Mineralsalzablagerungen mittels von Kossa-Färbung nach 8 Wochen *in vivo*, repräsentative Querschnitte aus der Subregion A1. 20x Vergrößerung, der schwarze Stern markiert das Lumen. Links ein FN-Tier, rechts ein Tier aus der Kontrollgruppe. In Arealen mit ausgeprägter Intimahyperplasie (schwarzer Kreis) kommen bräunlich-schwarze Mineralsalzablagerungen zur Darstellung.

In einigen Tieren der 8-Wochen Gruppe kamen auch degenerative Prozesse zur Darstellung, die sich morphologisch von diesen feinfleckigen Kalksalzablagerungen unterschieden. Große chondroide Zellen, welche sich in der HE-Färbung basophil darstellten, trieben die Neointima auf, es ließ sich in der von Kossa-Färbung eine lokale Einlagerung von Mineralsalzen nachweisen. Um eine weitere histologische Differenzierung dieser Zellen zu ermöglichen, wurden diese Stellen zusätzlich mittels Movat Pentachrom gefärbt und anschließend verschiedene Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt, u.a. mit Antikörpern gegen Syndecan-3, einem Marker für chondrogene Zellen (siehe Abb. 20 und 21).

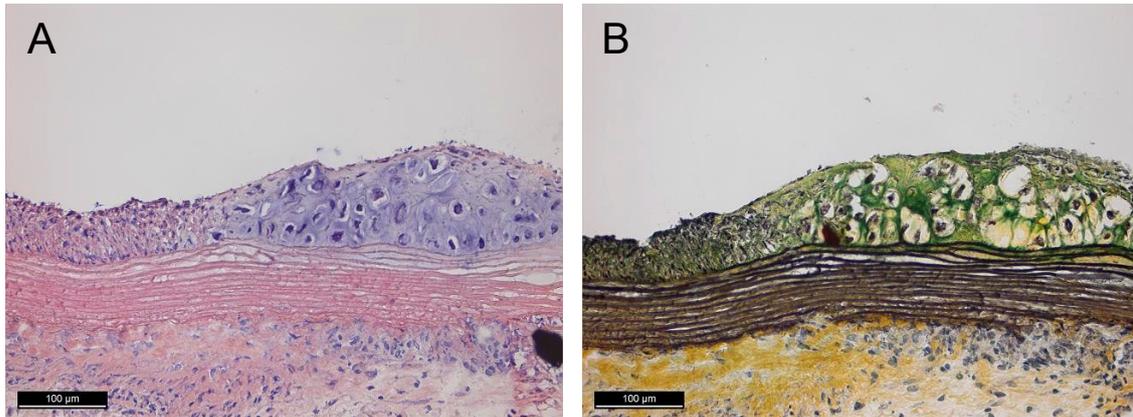


Abbildung 20 – Exemplarische Darstellung der chondroiden Zellen in der Neointima eines FN-Tieres nach 8 Wochen *in vivo*, Subregion A1. 20x Vergrößerung, das Lumen befindet sich oben im Bild. In der HE-Färbung links erscheinen die Zellen basophil, während in der Movat Pentachrom-Färbung die grünlich-bläulichen Färbung für eine vermehrte Glykosaminoglykan-Einlagerung spricht.

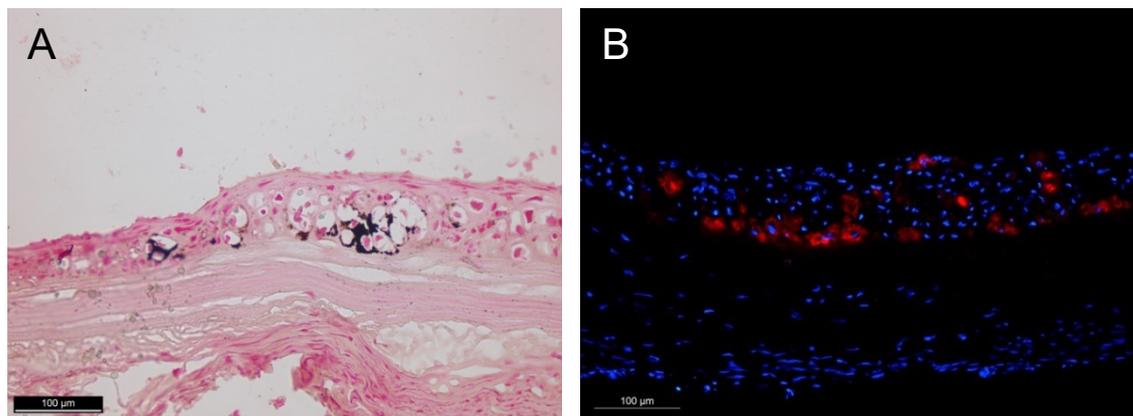


Abbildung 21 – Querschnitte aus demselben Versuchstier und derselben Subregion wie in Abb. 22. 20x Vergrößerung, das Lumen befindet sich oben im Bild. In Bild A zeigt die von Kossa-Färbung Mineralsalzaablagerungen (schwarz), angrenzend an die chondroiden Zellen. Korrelierend dazu zeigt Bild B eine Immunfluoreszenz zum Nachweis von Syndecan-3 mit deutlich positivem Signal (rot). Zellkerne wurden mittels DAPI blau gefärbt. (Quelle: Assmann et al., 2013)

Um eine eventuell ablaufende Immunreaktion aufdecken zu können, haben wir Immunfluoreszenzen zur Darstellung der Protein-Komplexe CD3 und CD68 durchgeführt, die typischerweise auf der Oberfläche von T-Zellen bzw. Makrophagen aufzufinden sind. Dabei konnten weder in der Versuchs- noch in der Kontrollgruppe die entsprechenden Entzündungsmarker im Gewebe nachgewiesen werden (siehe Abb. 22).

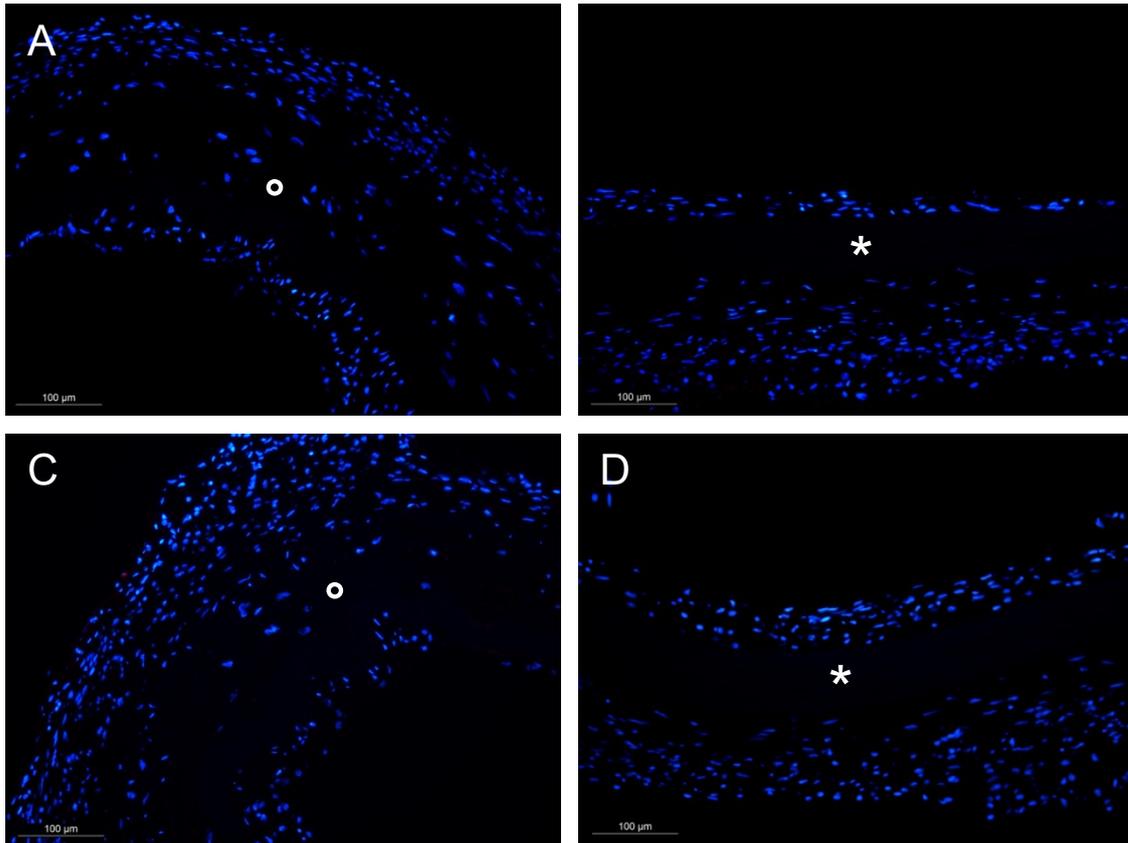


Abbildung 22 – Exemplarische Bilder der durchgeführten CD3/CD68-Immunfluoreszenzen. Bild A und C zeigen Tiere der FN-Gruppe nach 8 Wochen *in vivo*, Bild B und D Tiere der Kontrollgruppe. Zu keinem Zeitpunkt konnten wir CD3 (rot, A und B) oder CD68 (rot, C und D) im Gewebe nachweisen. Zellkerne wurden mittels DAPI blau gefärbt – es fällt dabei auf, dass in den FN-Tieren vereinzelte Zellkerne in der *Tunica media* zur Darstellung kommen (weißer Kreis), während die *Tunica media* der Kontrolltiere zellfrei erscheint (weißer Stern). 20x Vergrößerung. (Quelle: Assmann et al., 2013)

3.5.3 Repopularisierung der *Tunica media*

Während die *Tunica adventitia* schon nach 24 h erste Zellkerne aufwies und nach 4 Wochen *in vivo* auch die luminalen Wiederbesiedlung der Konduits deutlich vorangeschritten war, präsentierte sich die *Tunica media* der Aorta zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen nahezu vollständig zellfrei. Nach 8 Wochen *in vivo* konnten wir jedoch in allen Tieren der FN-Gruppe teils großflächige Areale mit einer ausgeprägten Zellbesiedlung zwischen den elastischen Fasern der *Tunica media* nachweisen. Somit haben wir die Konduits nicht nur hinsichtlich der luminalen Wiederbesiedlung evaluiert, sondern auch die Folgen einer FN-Beschichtung in der *Tunica media* untersucht.

Zwischen den elastischen Fasern der *Tunica media* waren in allen Tieren der FN-Gruppe nach 8 Wochen *in vivo* zahlreiche Zellkerne zu sehen, die von der adventitiellen Seite her in die Media einzuwachsen schienen (siehe Abb. 23 und 24). In den Konduits der Kontrollgruppe fanden wir nach 56 Tagen in keinem der Tiere Anzeichen einer ähnlichen Repopularisierung, die Media verblieb nahezu frei von Zellen. Durch eine Auszählung der Zellkerne (siehe 2.2.10.3) konnten wir eine signifikant höhere Zellzahl in der FN-Gruppe nachweisen ($p < 0,0001$, siehe Abb. 25). Dabei konnte ein gehäuftes Auftreten je nach Subregion nicht beobachtet werden.

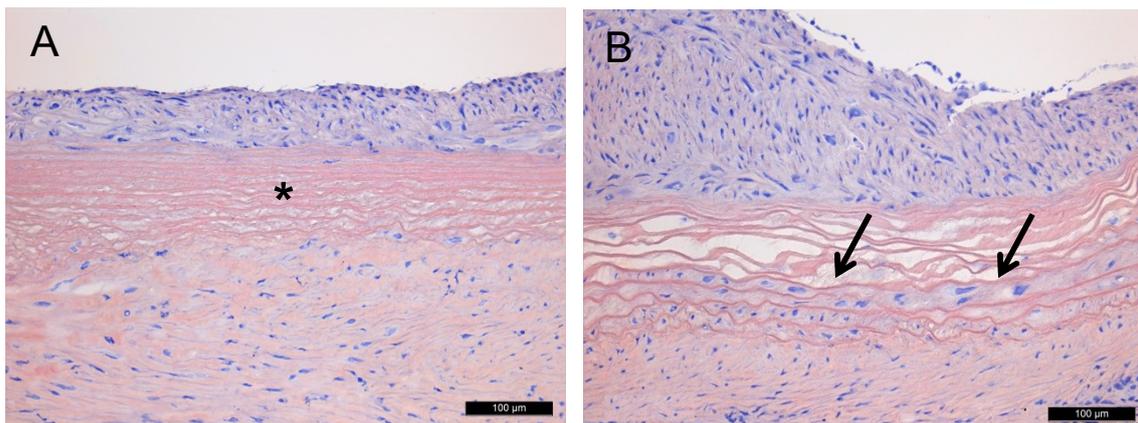


Abbildung 23 – Bild A zeigt einen HE-gefärbten Querschnitt eines Kontrolltieres nach 8 Wochen *in vivo*. Die *Tunica adventitia* erscheint zellreich während ein mehrschichtiges Epithel das Lumen auskleidet. Die *Tunica media* erscheint hingegen völlig zellfrei (schwarzer Stern). In Bild B ist ein FN-Tier nach 8 Wochen *in vivo* zu sehen. Hier präsentieren sich zwischen den Fasern der *Tunica media* multiple Zellkerne, mit Betonung der adventitiellen Seite (schwarze Pfeile). 20x Vergrößerung, das Lumen befindet sich oben im Bild. (Bild A - Quelle: Assmann et al., 2013)

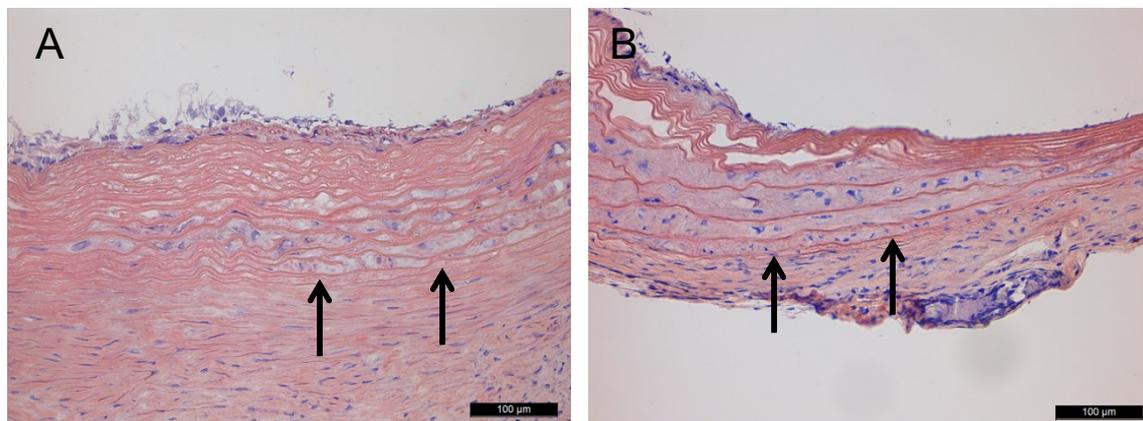


Abbildung 24 – Zwei weitere HE-gefärbte Querschnitte von FN-Tieren nach 8 Wochen *in vivo*. Auch hier erkennt man in der *Tunica media* eine Einwanderung von Zellen, die scheinbar von adventitiell her beginnt und Richtung Lumen fortschreitet. 20x Vergrößerung. (Bild A - Quelle: Assmann et al., 2013)

Quantifizierung der eingewanderten Zellen in der *Tunica media*

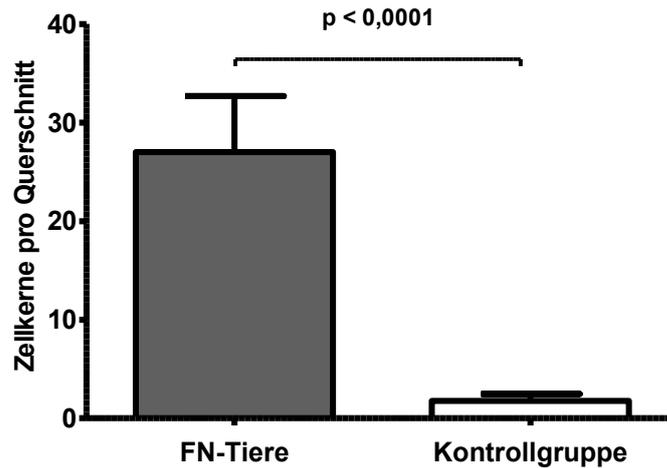


Abbildung 25 – Durchschnittliche Anzahl gezählter Zellkerne in der *Tunica media* nach 8 Wochen *in vivo*. Insgesamt waren in den FN-beschichteten Tieren signifikant mehr Zellen pro Querschnitt nachweisbar als in der Kontrollgruppe.

In weiteren Immunfluoreszenzen konnten wir zeigen, dass die medial eingewanderten Zellen aSMA-positiv waren. Korrelierend dazu ließ sich Desmin, ein Intermediärfilament und Teil des Zytoskeletts von u.a. glatten Muskelzellen in der *Tunica media* nachweisen, während Vimentin nur vereinzelt positiv erschien (siehe Abb. 26). Färbungen mit Antikörpern gegen Entzündungsmarker (CD3 und CD68) fielen auch hinsichtlich der *Tunica media* negativ aus (siehe Abb. 24).

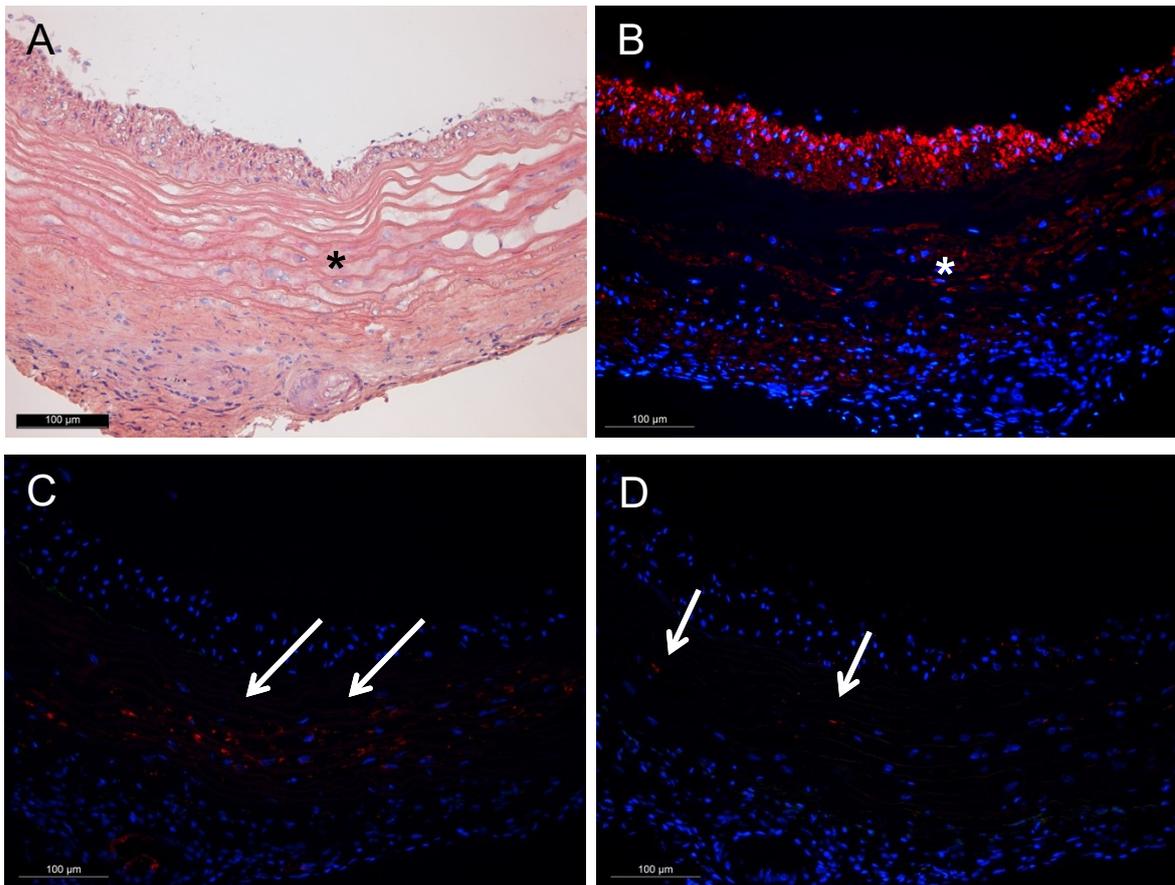


Abbildung 26 – Repräsentativer Querschnitt eines FN-Tieres nach 8 Wochen *in vivo*, 20x Vergrößerung. In Bild A und B sind eingewanderte Zellen in der *Tunica media* markiert (Stern), wobei Bild B ein korrelierendes positives aSMA Signal in der *Tunica media* nachweist (rot). Bild C und D zeigen Querschnitte aus derselben Subregion mit einem deutlich positiven Signal für Desmin (Bild C, Pfeilmarkierung, rot) und lediglich angedeutetem Nachweis von Vimentin (Bild D, Pfeilmarkierung, rot). (Quelle: Assmann et al., 2013)

Die Aktivität der MMP im Gewebe wurde mithilfe der *in situ*-Enzymographie dargestellt und anschließend mittels *ImageJ* quantitativ ausgewertet (siehe 2.2.9.7). Da primär die Subtypen MMP-2 und MMP-9 über Gelatinase-Aktivität verfügen, wurde somit überwiegend deren Aktivität bestimmt. Sowohl in Arealen mit hyperplastischer Neointima als auch im Bereich der eingewanderten Zellen in der *Tunica media* konnte dabei eine erhöhte Aktivität nachgewiesen werden (siehe Abb. 27). Im direkten Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe zeigte sich, dass die Aktivität in der FN-Gruppe sowohl nach 4 als auch nach 8 Wochen *in vivo* signifikant erhöht war ($p < 0,0001$ bzw. $p < 0,029$; siehe Abb. 28).

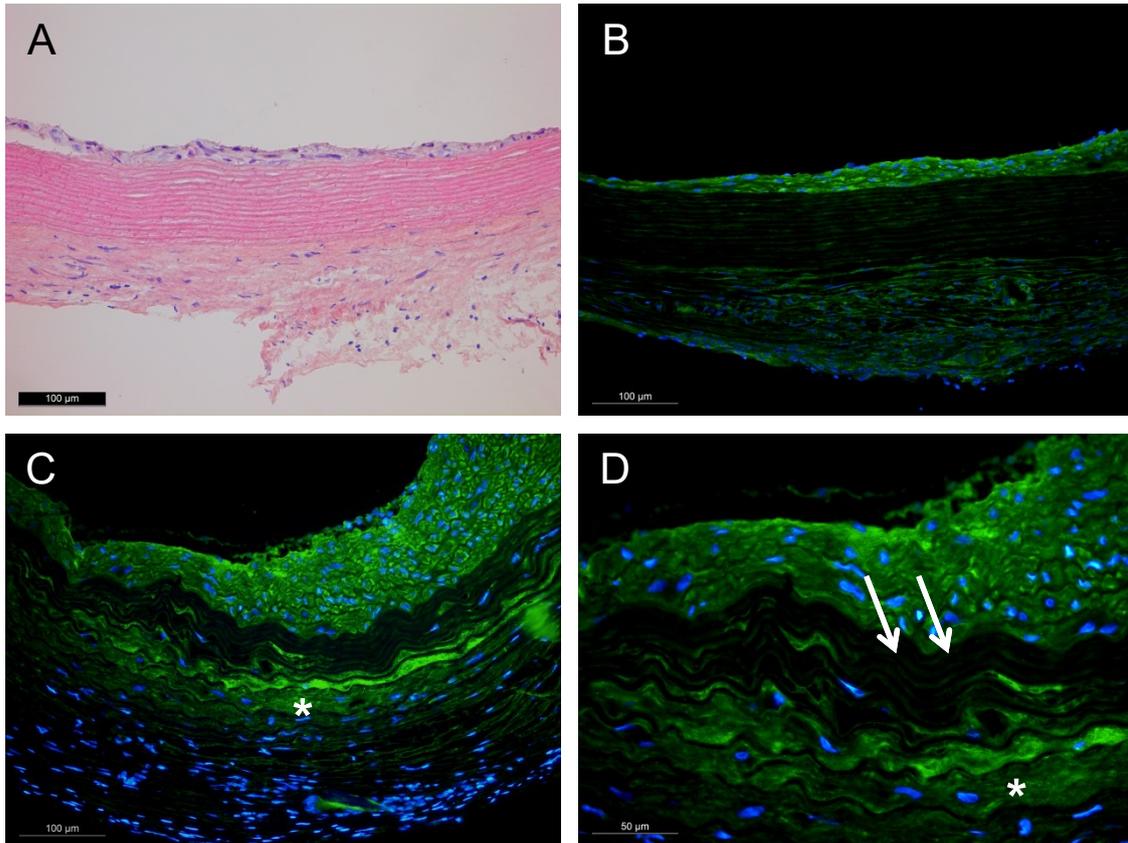


Abbildung 27 – Exemplarische Querschnitte von Tieren der FN-Gruppe nach 8 Wochen *in vivo*. Das Lumen befindet sich oben im Bild. Bild A zeigt eine HE-Färbung und korrelierend dazu zeigt sich unter B eine erhöhte MMP-Aktivität in der Neointima (grün), 20x Vergrößerung. Bild C und D zeigen dieselbe Subregion aus einem anderen FN-Tier in 20x bzw. 40x Vergrößerung. Der weiße Stern markiert die erhöhte MMP-Aktivität (grün) im wiederbesiedelten Anteil der *Tunica media*. Die weiter luminal gelegenen Schichten der Media wurden zu diesem Zeitpunkt noch nicht repopularisiert, somit ist keine MMP-Aktivität nachweisbar (weißer Pfeil). (Bild B, C - Quelle: Assmann et al., 2013)

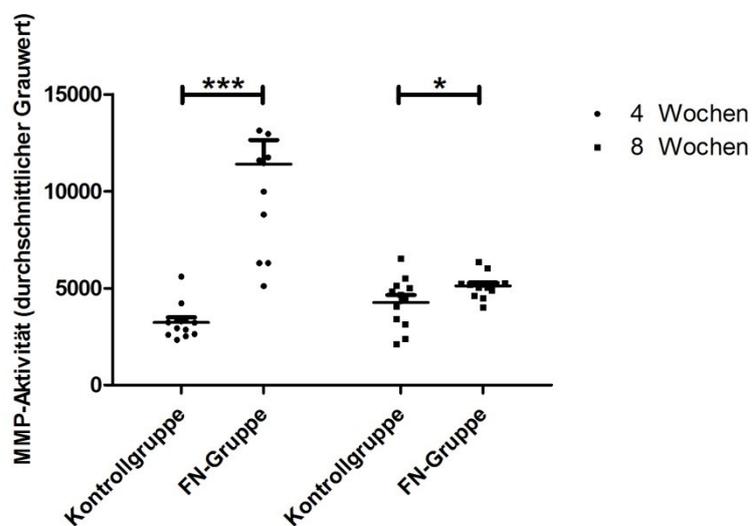


Abbildung 28 – Ergebnisse der quantitativen Auswertung der MMP-Aktivität mittels *ImageJ*. Nach 4 Wochen und 8 Wochen ist die Aktivität in der FN-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0,0001$ nach 4 Wochen bzw. $p < 0,029$ nach 8 Wochen). (Übersetzt aus: Assmann et al., 2013)

3.5 Ergebnisse der PCR

Durch eine Analyse der relativen Genexpression in den Konduits wollten wir Umbau- und Degenerationsprozesse in den Gefäßkonduits beider Versuchsgruppen auf genomischer Ebene vergleichen. Um Aufschluss über die Aktivität der einwandernden Zellen in den Konduits zu bekommen, verwendeten wir Primer für *aSMA*, *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM1) und *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM1). Als Marker für Inflammation und Prothrombogenität dienten *transforming growth factor-beta-1* (TGFb1), CD39 und CD73. Osteopontin (OPN), Osteokalzin (OCN) und alkaline Phosphatase (ALP) verwendeten wir, um Aussagen über chondro-osteogene Degeneration des Gewebes treffen zu können. Schließlich untersuchten wir ebenso Integrin-alpha-4 (ITNa4) und Intergrin-alpha-5 (ITNa5), die als Rezeptoren für FN fungieren. Von den untersuchten Genen zeigte sich lediglich für Osteokalzin ein signifikanter Unterschied in der relativen Genexpression (FN-Gruppe: $0,2 \pm 0,02$, Kontrollgruppe: $0,7 \pm 0,24$, $p = 0,045$; siehe Abb. 29C).

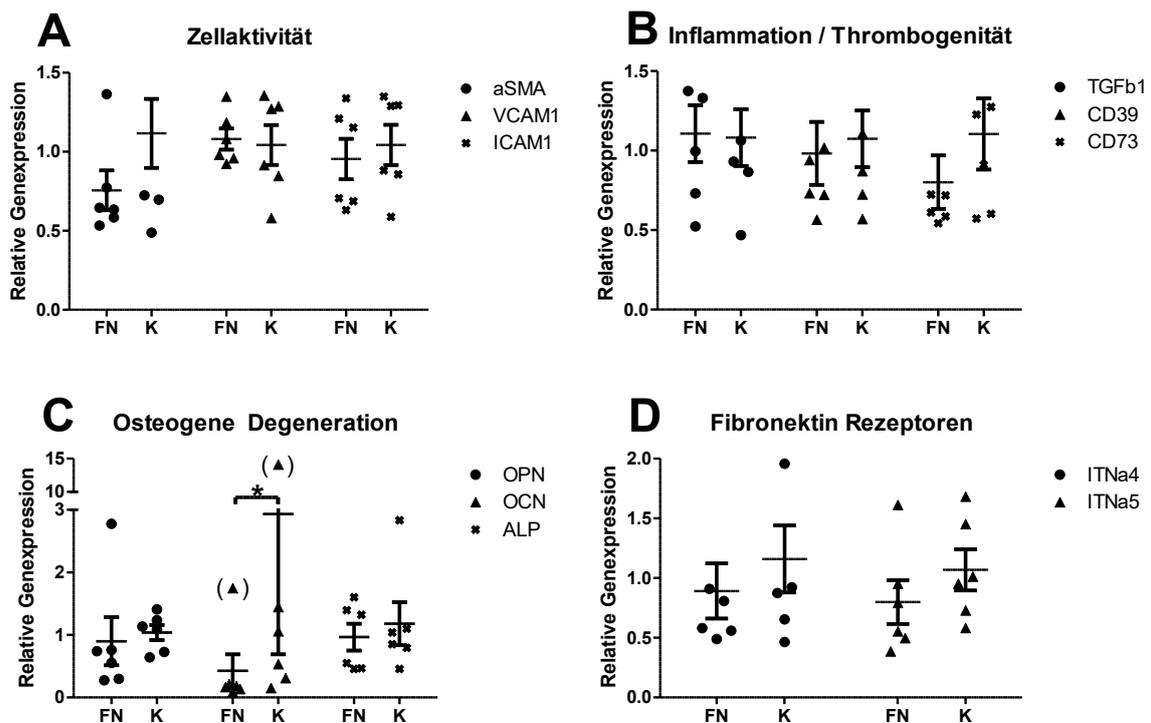


Abbildung 29 – Ergebnisse der PCR-Analyse von Konduits der FN- und Kontrollgruppe nach 8 Wochen *in vivo*. Lediglich für das Peptidhormon Osteokalzin (OCN) lässt sich ein signifikanter Unterschied nachweisen (Bild C). (Übersetzt aus: Assmann et al., 2013)

4. Diskussion

4.1 Persistenz der Fibronektin-Beschichtung

FN wurde schon in zahlreichen Studien erfolgreich zur Oberflächenmodifikation von Gefäßprothesen eingesetzt (Budd et al., 1990) (Shimada et al., 2004), auch in Kombination mit anderen chemotaktisch wirkenden Stoffen wie dem *stromal cell-derived factor 1* (De Visscher G. et al., 2012) (Flameng et al., 2013). Ungeklärt blieb in bisherigen Arbeiten jedoch oft die Frage, wie lange FN nach der initialen Beschichtung auf der Oberfläche persistiert. Erste *in vitro*-Ergebnisse zu dieser Fragestellung wurden von Ramalanjaona *et al.* beschrieben. Es wurden synthetische Polytetrafluoroethylen (PTFE)-Prothesen in 10-500 µg/ml radioaktiv markiertem FN inkubiert und anschließend die Persistenz nach 24 h *in vitro* bestimmt (Ramalanjaona et al., 1986). Unbeantwortet blieb hier jedoch die Frage nach der Langzeitpersistenz des FN.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Fluoreszenzmarkierung des humanen FN erstmals seine *in vivo*-Persistenz auf dezellularisiertem Gewebe auch über einen längeren Zeitraum von mindestens 8 Wochen nachgewiesen werden. Inwiefern die Abnahme der Signalintensität des konjugierten FN im Laufe der Zeit durch das Auswaschen aus der extrazellulären Matrix zustande kommt, ist jedoch nicht gesichert. Möglich ist auch, dass lediglich der fluoreszente Marker Alexa488 sich aus der Bindung löst oder im Laufe der Zeit an Intensität verliert, während das FN weiter im Gewebe gebunden bleibt.

4.2 Fibronektin zur luminalen Oberflächenmodifikation

Sowohl synthetische PTFE- sowie Dacron-Prothesen als auch dezellularisierte Gefäßkonduits besitzen eine gemeinsame Schwachstelle: Die luminale Seite ist zum Zeitpunkt der Implantation nicht durch eine Endothelschicht bedeckt, so dass das Blut des Empfängers direkten Kontakt zum Fremdmaterial bzw. zu der dezellularisierten extrazellulären Matrix hat. Die hieraus potentiell resultierenden inflammatorischen und prothrombogenen Trigger können den Degenerationsprozess der Implantate negativ beeinflussen (Davie, 1995) (Zhou et al., 2010). Für die Funktionalität der zellfreien Prothesen ist es somit von größter Wichtigkeit, dass nach Implantation eine schnelle autologe *in vivo*-

Endothelialisierung stattfindet, um Thrombusbildung, Inflammation oder intimale Hyperplasie zu begrenzen. Wir konnten in dieser Arbeit nachweisen, dass die Oberflächenbeschichtung mit FN die *in vivo*-Reendothelialisierung der FN-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe nach 8 Wochen *in vivo* signifikant beschleunigt. Auf Höhe der Aortenklappe war dieser Effekt sogar schon nach 4 Wochen ersichtlich. Frühere Studien haben ähnlich positive Effekte der FN-Beschichtung beschrieben: De Visscher *et al.* konnten 2012 nachweisen, dass die kombinierte chemotaktische Wirkung einer Beschichtung mit FN und dem *stromal cell-derived factor 1* auf Gefäßprothesen aus Polyester *in vivo* zu einer verbesserten Endothelialisierung führte. Auch in *in vitro*-Versuchen wurde schon über die Vorteile einer FN-Beschichtung berichtet (Budd *et al.*, 1990). Neben diesen antithrombogenen und adhäsionsfördernden Eigenschaften konnte unsere Arbeitsgruppe schon in einer Studie aus 2010 zeigen, dass FN *in vitro* auch die degenerative Kalzifikation oviner valvulärer Interstitialzellen in Anwesenheit von TGF-beta reduziert (Gwanmesia *et al.*, 2010) und somit auch hinsichtlich der valvulären Degeneration eine protektive Wirkung ausüben könnte.

Neben der hier beobachteten *in vivo*-Reendothelialisierung besteht die Alternative, noch vor Implantation der kardiovaskulären Prothese eine Besiedlung mit Zellen *in vitro* durchzuführen, um eine geschlossene Endothelschicht sicherzustellen, noch bevor die Prothese mit dem Wirtsblut in Kontakt kommt, und damit das thrombogene Potential der zellfreien Wand zu umgehen. Insbesondere Verfahren zur autologen Transplantation von Endothelzellen spielen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle (Kim *et al.*, 2000) (Mol *et al.*, 2005). Auch in diesem Zusammenhang könnte FN eine positive Wirkung ausüben: Budd *et al.* konnten nachweisen, dass eine Vorbehandlung der verwendeten PTFE-Prothesen mit 20 µg/ml FN schon nach 10-120 Minuten zu einer signifikant verbesserten endothelialen Besiedlung *in vitro* im Vergleich zu unbeschichteten Prothesen führt. Griese *et al.* konnten in einer ähnlichen Studie durch zelluläre Besiedlung vaskulärer Prothesen vor Implantation bis zu 70 Prozent des Gefäßlumens mit Endothelzellen bedecken. Nach 1-2 Wochen *in vivo* verblieb jedoch lediglich 10 Prozent der luminalen Fläche besiedelt (Griese *et al.*, 2003). Die *in vitro*-Besiedlung von Gefäßprothesen stellt also im besonderen Hinblick auf die Persistenz der kultivierten Zellen nach Implantation des besiedelten Konduits eine

große Herausforderung dar. Dies ist nicht zuletzt den im Blutkreislauf plötzlich auf die Zellen einwirkenden hämodynamischen Bedingungen, insbesondere den lokalen Scherkräften, zuzuschreiben. Aus dieser Überlegung heraus wurden Bioreaktoren entwickelt, um die physiologischen Bedingungen im Körper schon *in vitro* simulieren zu können. Durch eine Präkonditionierung der besiedelten Prothesen erhoffte man sich wiederum die Stabilität und Adhäsion der besiedelnden Zellen zu verbessern. In präklinischen Versuchen in einem ovinen Tiermodell konnten Lichtenberg *et al.* 2006 an dezellularisierten Herzklappen die Vorteile eines solchen Bioreaktors darstellen. Dezellularisierte Pulmonalklappen wurden in einem Bioreaktor mit Endothelzellen besiedelt und anschließend in Lämmern implantiert. Nach 3 Monaten *in vivo* konnte gezeigt werden, dass diese präkonditionierten Herzklappen eine verbesserte Endothelialisierung mit weniger Thrombusbildung und weniger Neointimahyperplasie aufwiesen, verglichen mit der nicht-besiedelten Kontrollgruppe (Lichtenberg *et al.*, 2006). Auch in Bioreaktoren fand man Verwendung für das FN: Baguneid *et al.* zeigten die protektive Wirkung einer Prothesen-Beschichtung mit FN auf die Adhäsionsstärke bzw. –effizienz von Endothelzellen unter 7-tägiger rheologischer Belastung im Bioreaktor (Baguneid *et al.*, 2004). Verglichen wurde die Persistenz der Endothelzellen auf FN-beschichteten *tissue engineereten Grafts* auf Basis einer Dacron-Prothese mit unbeschichteten Kontrollen, mit und ohne Präkonditionierung durch pulsatilen Fluss im Bioreaktor. Dabei konnten für die FN-beschichtete Gruppe die besten Ergebnisse hinsichtlich der endothelialen Beschichtung erzielt werden – interessanterweise unabhängig davon, ob vor der *in vitro*-Besiedlung eine Präkonditionierung im Bioreaktor stattfand oder nicht. Zudem muss bedacht werden, dass moderne Bioreaktoren eine zeitaufwändige und teure Methode zur präoperativen Konditionierung darstellen. Es besteht des Weiteren ein erhöhtes Risiko für eine Kontamination oder Infektion der Prothesen bedingt durch die verlängerten Lagerungszeiten im Reaktor. Die Beschichtung mit biofunktionellen Stoffen, wie dem FN, vor Implantation ist hingegen vergleichsweise günstig sowie einfach durchzuführen und hat schon gute Ergebnisse geliefert – sowohl in Kombination mit als auch ohne den Einsatz von Bioreaktoren.

In dieser Arbeit präsentierte sich die luminale Reendothelialisierung in der FN-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe deutlich beschleunigt. Um zunächst zu verifizieren, dass die luminale Fläche des Gefäßkonduits, welche mit dem Wirtsblut in direktem Kontakt steht, durch Endothel ausgekleidet wird haben wir indirekte Immunfluoreszenzen zum Nachweis des Endothelzellenmarkers vWF (Sadler et al., 1995) durchgeführt. Das beobachtete bandenförmige Signal auf der luminalen Seite der Neointima spricht dafür, dass selbst Areale mit Neointimahyperplasie durch eine regelrechte Endothelzellenschicht ausgekleidet werden (siehe Abb. 17).

Die luminale Reendothelialisierung war vor allem in den anastomosennahen Subregionen (A1 und B2) des Konduits beschleunigt. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die luminale Besiedlung kardiovaskulärer Implantate hauptsächlich durch einwachsende Zellen aus den Anastomosenregionen vorangetrieben wird, wie es auch schon für synthetische Gefäßprothesen beschrieben ist (Rotmans et al., 2006). Dennoch waren bereits nach 28 Tagen entlang der luminalen Oberfläche vereinzelte Zonen von Neoendothel zu finden, welche keinen direkten Kontakt zu den Anastomosenregionen hatten. Dies ist ein Indiz dafür, dass Zellen aus dem zirkulierenden Blut in der Lage waren, durch Adhäsion am Konduit eine Reendothelialisierung zu initialisieren – obwohl die kontinuierliche Wiederbesiedlung über angrenzendes natives Gewebe in unserem Modell dominant scheint. Neben der Beschaffenheit der luminalen Wand und der Nähe zur Anastomosenregion könnten auch durch den Blutstrom entstehende Scherkräfte die Wiederbesiedlung des Lumens beeinflussen. Vor allem im Bereich des Aortenbogens wirken durch den pulsatilen Blutfluss verstärkt Scherkräfte auf die Aortenwand (Assmann et al., 2012b). Eine solche Belastung könnte zum einen die Ansiedlung neuer Endothelzellen erschweren, zum anderen reagieren vorhandene Endothelzellen auf eine solche Belastung mit der Freisetzung verschiedener Botenstoffe und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die zu einem strukturellen *Remodelling* der Zellen führt (Ballermann et al., 1998). Interessanterweise konnte man sich dieses *Remodelling* schon zunutze machen, um die Biofunktionalität von kardiovaskulären Prothesen zu verbessern. Ott *et al.* haben synthetische Gefäßprothesen zunächst mit Endothelzellen besiedelt und anschließend *in vitro* über mehrere Tage erhöhten Scherkräften ausgesetzt.

Es zeigte sich, dass eine solche Präkonditionierung die Adhäsion der Zellen verstärkt und damit auch die Thrombogenität der Prothese reduziert (Ott, 1995) (Ballermann, 1995).

Neben den geschilderten Vorteilen einer FN-Beschichtung zur luminalen Oberflächenmodifizierung konnten in dieser Arbeit auch nachteilige Auswirkungen beobachtet werden, die möglicherweise auf das FN zurückzuführen sind. Die Wiederbesiedlung des Lumens wurde zwar beschleunigt, aber gleichzeitig kam es zu einer verstärkten Intimahyperplasie. Auch hier beschränkten sich die Zellwucherungen zunächst auf die anastomosennahen Subregionen. Nach 8 Wochen war jedoch auch in Teilen des Aortenbogens (Subregion A2 und B1) eine deutliche Hyperplasie nachzuweisen. Eine solche Intimahyperplasie könnte u.a. entstehen, wenn der Blutkreislauf des Empfängers Kontakt hat mit der endothelfreien Oberfläche des Konduits - ein Grund warum die Wiederbesiedlung der Prothese für ihre Biofunktionalität eine so wichtige Rolle spielt. Nach 8 Wochen zeigte sich in vereinzelten Arealen mit ausgeprägter Neointimahyperplasie, neben den homogen aSMA-positiven Zellen, auch vereinzelte Zellen eines chondroiden Phänotyps. Korrelierend dazu konnte die von Kossa-Färbung in diesen Regionen deutliche Spuren von Mineralsalzablagerungen nachweisen. Mittels Immunfluoreszenz konnte in demselben Zellcluster zudem ein positives Signal für Syndecan-3 nachgewiesen werden (siehe Abb. 20 und 21). Diese histologischen Ergebnisse bestärkt die Hypothese, dass sich diese Zellen in einer frühen Phase chondro-osteogener Transformation befinden, ein degenerativer Prozess welcher schon in zahlreichen Studien gut dokumentiert wurde (Abedin et al., 2004). Des Weiteren wurde in diesen Arealen durch eine *in situ*-Enzymographie auch eine erhöhte Matrix-Metalloprotease-Aktivität nachgewiesen – ein Ergebnis, das für einen lokal verstärkten Gewebeumbau in diesen Regionen spricht. Aus der Beobachtung, dass chondro-osteogene Transformation und Calciumablagerungen nur in Arealen starker Neointimahyperplasie auftraten, lässt sich schlussfolgern, dass durch eine effektive Unterbindung dieser Hyperplasie mutmaßlich auch die frühzeitige kalzifizierende Degeneration der Aortenkonduits verhindert werden könnte, da außerhalb der hyperplastischen Neointima keine degenerativen Umbauprozesse nachzuweisen waren. Insgesamt decken sich diese Ergebnisse unserer Arbeit mit

einer Langzeitstudie, in der Polycaprolakton-Prothesen infrarenal in Ratten implantiert wurden. Nach 18 Monaten *in vivo* zeigte sich ein sehr ähnliches histologisches Bild, geprägt von neointimaler Hyperplasie sowie beginnender chondroider Degeneration und Kalzifikation (De Valence S. et al., 2012).

Neben der morphologischen Charakterisierung der Konduits wurde in der vorliegenden Arbeit auch mithilfe immunhistologischer Verfahren und der qRT-PCR nach Anzeichen von Thrombusbildung und Immunreaktionen gesucht. Histologisch ließen sich dabei in keinem der Tiere Implantat-Thrombosen erkennen. Es wurde in den durchgeführten Immunfluoreszenzen keine relevante Anzahl an CD3- bzw. CD68-positiven Immunzellen nachgewiesen, weder in der FN- noch in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Studienlage: So wurde schon in mehreren Groß- und Kleintierstudien die Abwesenheit von Thrombusbildung und Immunantwort nach erfolgreicher Dezellularisierung von Aortenklappenprothesen beschrieben (De Valence S. et al., 2012) (Meyer et al., 2005) (Grauss et al., 2003).

Zusammenfassend hat die hier verwendete Technik zur FN-Beschichtung ausgezeichnet funktioniert; selbst nach 8 Wochen *in vivo* scheint das FN auf den Konduit-Oberflächen zu persistieren. Durch die Akzeleration der Wiederbesiedlung der luminalen Oberfläche mit Endothelzellen wurde ein weiteres Hauptziel der Arbeit erfüllt. Da es in der FN-Gruppe jedoch auch zu einer signifikanten Verstärkung der Neointimahyperplasie kam, erscheinen Folgestudien zwecks Optimierung der Oberflächen-Beschichtung mit biofunktionalen Proteinen angebracht.

4.3 Fibronektin zur adventitiellen Oberflächenmodifikation

Nach einer Detergenzien-basierten Dezellularisierung bleibt im Idealfall die Basalmembran des Gefäßkonduits intakt. Diese Membran stellt eine natürliche Barriere für Zellen dar, die versuchen, aus dem Blutstrom des Empfängers in das azelluläre Gewebe überzusiedeln. Während nach 7 Tagen *in vivo* die luminalen Seite der Konduits kaum besiedelt war, konnten wir schon nach 24 h zahlreiche Zellen in der Adventitia nachweisen. Somit ist nicht nur die Beschichtung der luminalen Gefäßwand ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit, sondern auch die der *Tunica adventitia*.

Nach 8 Wochen *in vivo* zeigte sich die *Tunica media* der Kontrollgruppe nahezu zellfrei. Zwischen den elastischen Fasern der Media in der FN-Gruppe kam hingegen eine hoch signifikant erhöhte Zellzahl zur Darstellung ($p < 0,0001$). Dabei zeigte das histologische Bild, dass die eingewanderten Zellen in Nähe der Adventitia besonders zahlreich waren, während es Richtung Lumen hin immer weniger wurden. Dies deutet darauf hin, dass bedingt durch die FN-Beschichtung auf der adventitiellen Seite des Konduits vermehrt Zellen aus der *Tunica adventitia* in Richtung *Tunica media* wandern. Nur wenige Zellen scheinen aus dem Blutstrom die Basalmembran zu durchqueren.

Da die histologischen Untersuchungen gezeigt haben, dass es in der FN-Gruppe zu einer autologen Wiederbesiedlung der *Tunica media* gekommen ist, haben wir diese Zellen weiter charakterisiert. In einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung konnte nachgewiesen werden, dass die eingewanderten Zellen aSMA enthielten, genau wie die luminal wachsenden Zellen der Neointima. Als Teil des Zytoskeletts gilt das Protein aSMA als etablierter Marker für aktivierte Interstitialzellen, insbesondere für Myofibroblasten (Baum and Duffy, 2011). Neben dem positiven Signal für aSMA zeigte sich ebenso, dass die in der *Tunica media* eingewanderten Zellen, im Gegensatz zu den Zellen in der hyperplastischen Neointima, zusätzlich Desmin-positiv waren (siehe Abb. 26). Desmin ist ein Intermediärfilament und ein Teil des Zytoskeletts von Skelett-, Herz- sowie glatter Muskulatur und spielt eine wichtige Rolle für die strukturelle Integrität von Muskelzellen (Paulin, 2004). Zudem gilt Desmin als Marker für Myofibroblasten, auch wenn die genaue Zusammensetzung des Zytoskeletts dieser Zellen je nach Gewebe durchaus

heterogen ist (Schmitt-Graff et al., 1994). In den wiederbesiedelten Arealen der *Tunica media* konnte kein eindeutiger Nachweis des Intermediärfilaments Vimentin erbracht werden. Aufgrund des positiven Signals für Desmin sowie der fehlenden Nachweisbarkeit von Vimentin könnte geschlussfolgert werden, dass die aSMA-positiven, Desmin-positiven, Vimentin-negativen Zellen der *Tunica media* als glatte Muskelzellen zu klassifizieren sind. Die aSMA-positiven Zellen der hyperplastischen Neointima wiesen hingegen kein Desmin auf, wie es eher für aSMA-positive Myofibroblasten zu erwarten wäre. Diese Ergebnisse sind kohärent mit einer Arbeit von Shi et al. aus 1996, in der die Einwanderung und Differenzierung adventitieller Fibroblasten in die *Tunica media* einer verletzten Gefäßwand beschrieben wurden (Shi et al., 1996). Analog zu den Ergebnissen unserer Arbeit konnten dabei gezeigt werden, dass zuvor markierte Zellen in der Lage waren, aus der *Tunica adventitia* in die *Tunica media* zu wandern und dort nach Differenzierung aSMA-positiv erschienen.

FN spielt für die Zelladhäsion und –migration im Körper eine wichtige Rolle. Diese Aufgaben erfüllt es unter anderem in Zusammenarbeit mit verschiedenen Transmembranproteinen, allen voran alpha-5-beta-1-Integrin. Das FN bindet an $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptoren auf der Zelloberfläche, was wiederum eine Kaskade an intrazellulärer Signaltransduktion startet und die lokale Zelladhäsion verstärkt. Zudem regt FN über $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptoren die Proliferation von Epithelzellen über den *epidermal growth factor*-Rezeptor an (Kuwada and Li, 2000). Mit den Explantaten beider Gruppen wurde eine qRT-PCR durchgeführt, um untersuchen zu können, ob sich die Expression der für $\alpha 5\beta 1$ -Integrin kodierenden Gene verändert. Dabei haben wir festgestellt, dass zwischen FN-Gruppe und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied nachzuweisen war. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass $\alpha 5\beta 1$ -Integrin eine wesentliche Rolle bei der Wiederbesiedlung der *Tunica media* gespielt hat, denn wir konnten in der durchgeführten qRT-PCR lediglich ganze Explantate analysieren. Da die Anzahl der neu eingewanderten Zellen in der *Tunica media* dabei im Verhältnis zu der Gesamtzahl an Zellen relativ niedrig war, könnte eine lokal und evtl. auch zeitlich begrenzte Hochregulation der $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Expression in der großen Masse an Zellen nicht nachweisbar gewesen sein.

Zur Evaluation der MMP-Aktivität wurde in den Arealen mit medialer Wiederbesiedlung zudem eine *in situ*-Enzymographie durchgeführt, welche die Gelatinase-Aktivität widerspiegelt und somit primär MMP-2 und MMP-9 detektiert. Dabei konnte dargestellt werden, dass eine Erhöhung der MMP-Aktivität mit den eingewanderten Zellen kolokalisiert war. Dies deutet auf einen verstärkten Gewebeumbau in den entsprechenden Arealen hin – möglicherweise angeregt durch die FN-Beschichtung. Diese Hypothese wird unterstützt durch weitere Studien, die belegen, dass FN nicht nur die $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Expression hochreguliert, sondern auch auf die Expression der MMP-Homologe MMP-2 und MMP-9 eine verstärkende Wirkung ausübt (Yang et al., 2012) (Cha and Purslow, 2010). Damit könnte die erhöhte MMP-Aktivität der FN-Gruppe in der *in situ*-Enzymographie erklärt werden. Auch in der *Tunica media* der Explantate wurden in den durchgeführten Immunfluoreszenzen keine Anzeichen einer immunologischen Abwehrreaktion gesehen, ebenso waren die qRT-PCR-Analysen hinsichtlich der Entzündungsmarker VCAM-1 und ICAM-1 unauffällig. Dies spricht dafür, dass die angestrebte Dezellularisierung erfolgreich war und dass die beobachteten Umbauprozesse in der *Tunica media* und *intima* nicht durch Entzündungsreaktionen getriggert werden. Vielmehr scheint der Empfänger zu versuchen, die azelluläre Matrix umzubauen, autolog zu besiedeln und somit in den Organismus zu integrieren.

Insbesondere die Abwesenheit einer Immunreaktion gegen die dezellularisierten Konduits sowie die Beschleunigung der funktionellen Wiederbesiedlung der Prothesen durch Oberflächenbeschichtung mit bioaktiven Proteinen stellen für die Biokompatibilität der *Grafts* essenzielle Aspekte dar. Somit dienen die Resultate dieser Arbeit auch als Grundlage für die Beforschung der weiterführenden Optimierung der Biofunktionalität und Haltbarkeit kardiovaskulärer Prothesen.

4.4 Begrenzungen dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden erfolgreich die Auswirkungen einer FN-Beschichtung auf ein im Kleintiermodell implantiertes, dezellularisiertes Gefäßkonduit untersucht und beschrieben. Während dieses etablierte Modell zwar eine kosten- und zeitsparende Alternative zu Großtierversuchen bietet, können jedoch nicht alle Ergebnisse pauschal für die Humananwendung übernommen werden. Grundsätzlich gibt es zwischen verschiedenen Spezies Unterschiede auf zellulärer wie molekularer Ebene. Daraus resultiert, dass die hier beschriebenen Vorgänge bei der Wiederbesiedlung von azellulären Matrizen im Menschen anders ablaufen könnten. Des Weiteren muss bedacht werden, dass vor allem ältere Patienten, die eine operative Versorgung von z.B. Klappenvitien nötig haben, oftmals Komorbiditäten, wie z.B. arterielle Hypertonie oder Diabetes mellitus aufweisen. Welchen Einfluss solche Erkrankungen auf azelluläre Prothesen im Menschen haben könnten, ist weitestgehend unerforscht. Zusätzlich können auch die vom Patienten eingenommenen Medikamente zu einer veränderten metabolischen Lage führen, was wiederum Auswirkungen auf die Interaktion mit den implantierten Gefäßkonduits haben könnte. Um die Effekte der FN-Beschichtung auf dezellularisiertem Gewebe noch genauer untersuchen zu können, sind weitere präklinische Studien nötig, vorzugsweise in einem adäquaten Großtiermodell und unter Einbeziehung klinisch relevanter metabolischer Pathologien.

5. Zusammenfassung

Die operative und interventionelle Versorgung von Herzklappenerkrankungen nimmt in unserer zunehmend alternden Gesellschaft einen großen Stellenwert ein. Die heute verwendeten Herzklappenprothesen führen jedoch vor allem für jüngere Patienten teils gravierende Probleme mit sich, zu denen insbesondere begrenzte Haltbarkeit und lebenslang notwendige Antikoagulation gehören. Eine Möglichkeit, biologische Herzklappen mit einer hohen Verfügbarkeit herstellen zu können, die die Limitierungen konventioneller Prothesen überwinden, bietet das Forschungsgebiet *tissue engineering*. Durch die Implantation dezellularisierter Gewebe-Matrizen kann einer Immunantwort des Empfängers vorgebeugt werden. In der Hoffnung, die Wiederbesiedlung der dezellularisierten Herzklappe *in vivo* zu beschleunigen und damit die Biofunktionalität des Gefäßkonduits zu verbessern, haben wir die zelladhäsionsfördernden Eigenschaften des Glykoproteins Fibronectin (FN) verwendet. Die Versuche wurden in einem von uns zuvor etablierten Kleintiermodell mit Ratten durchgeführt. Wir haben zunächst die Aortenklappe mit angrenzendem Aortenkonduit aus Spendertieren (Wistar-Ratten, n = 36) explantiert und mit einem Detergenzien-basierten Protokoll dezellularisiert. Die explantierten Konduits der Versuchsgruppe (n = 18) wurden für 24 h in fluoreszenzmarkiertem humanem FN (50 µg/ml) inkubiert und anschließend in infrarenaler Position mit der nativen Aorta der Empfängerratten anastomosiert. Die Kontrollgruppe bestand aus dezellularisierten Konduits ohne FN-Beschichtung (n = 18). Nach einem 7, 28 und 56 Tagen erfolgte die histologische und immunhistologische Auswertung (n = 24). Nach 28 und 56 Tagen wurde die Enzymaktivität der Matrix-Metalloproteinasen mittels *in situ*-Enzymographie bestimmt (n = 12). Acht Wochen nach Implantation wurde die Genexpression verschiedener Entzündungs- und Proliferationsmarker mittels quantitativer *real-time*-PCR analysiert. Auch nach 8 Wochen in der systemischen Zirkulation der Empfängerratte konnte das fluoreszenzmarkierte humane FN nachgewiesen werden. Es kam innerhalb der FN-Gruppe zu einer signifikant beschleunigten Reendothelialisierung, vor allem im Bereich der Anastomosen. Nach 8 Wochen zeigte sich in dieser Gruppe jedoch auch eine progrediente Intimahyperplasie – stellenweise mit Nachweis chondro-osteogener Transformation als erstes Anzeichen einer degenerativen Kalzifikation. Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass FN die Wiederbesiedlung der muskulären Gefäßwand anregt. Zwischen den elastischen Fasern der *Tunica media* fanden sich in der FN-Gruppe neu eingewanderte glatte Muskelzellen - ein Indiz dafür, dass die FN-Oberflächenbeschichtung eine gewebspezifische Wiederbesiedlung induzieren kann. Es waren zu keinem Zeitpunkt Thrombosen oder eine immunologische Abwehrreaktion erkennbar – somit kann auch die Detergenzien-basierte Dezellularisierung als erfolgreich gewertet werden. Die Abwesenheit einer Immunantwort ist ein wichtiger Aspekt, denn dadurch scheint ausgeschlossen, dass der beschriebene Umbau des Gefäßkonduits durch Entzündungsprozesse getriggert wurde. Die FN-Beschichtung hat in diesem Projekt zwei wesentliche Ziele im Kontext der Optimierung der Biokompatibilität und -funktionalität kardiovaskulärer Implantate erreicht: eine Beschleunigung der Reendothelialisierung und die Anregung einer Wiederbesiedlung der *Tunica media*. Die verstärkte Intimahyperplasie spricht jedoch dafür, dass eine reine FN-Beschichtung dezellularisierter Gefäßprothesen unter diesen Bedingungen keine optimale Lösung darstellt. Es sind weitere Versuche nötig, um zu erarbeiten wie man sich die positiven Eigenschaften des FN oder anderer bioaktiver Proteine bei der Weiterentwicklung *tissue engineerter* kardiovaskulärer Prothesen zunutze machen kann.

6. Eigene Publikationen und Vorträge

6.1 Kongressbeiträge

Die hier präsentierten Ergebnisse wurden auf folgenden internationalen Kongressen in Form von mündlichen Präsentationen vorgestellt:

- American Heart Association Scientific Sessions, Los Angeles 2012
- The Society for Heart Valve Disease Meeting, New York 2012
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Freiburg 2012
- Biennial Meeting on Heart Valve Biology and Tissue Engineering, Mykonos 2012.

6.2 Veröffentlichung in Fachzeitschriften

Biomaterials (2013): **Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating** (A. Assmann, C. Delfs, H. Munakata, F. Schiffer, K. Horstkotter, K. Huynh, M. Barth, V.R. Stoldt, H. Kamiya, U. Boeken, A. Lichtenberg, P. Akhyari; 34(25): 6015-6026.)

Impact Factor 2014: 8,6

Journal of Surgical Research (2012): **Development of a growing rat model for the in vivo assessment of engineered aortic conduits** (A. Assmann, P. Akhyari, C. Delfs, U. Flogel, C. Jacoby, H. Kamiya, and A. Lichtenberg; v. 176, no. 2, p. 367-375.)

Impact Factor 2014: 1,9

7. Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkaline Phosphatase
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
aSMA	Alpha-smooth muscle actin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAPI	Diamidinophenylindol
DCA	Desoxycholsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPH	Dezellularisierte pulmonale Homografts
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESC/EACTS	European Society of Cardiology / European Association for Cardio-Thoracic Surgery
FN	Fibronectin
FN488	Alexa488-konjugiertes Fibronectin
HCl	Chlorwasserstoff
ICAM1	Intercellular cell adhesion molecule-1
IE	Internationale Einheiten
ITNa4	Integrin-alpha-4
ITNa5	Integrin-alpha-5
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
OCN	Osteokalzin
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PTFE	Polytetrafluorethylen
qRT-PCR	Quantitative real-time-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAVI	Transapikale Aortenklappenersatz
TGFb1	Transforming growth factor-beta-1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vWF	Von-Willebrand-Faktor

8. Literaturverzeichnis

- Abedin M, Tintut Y, Demer L L. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004; 24(7): 1161-1170.
- Agmon Y, Khandheria B K, Meissner I, Sicks J R, O'Fallon W M, Wiebers D O, Whisnant J P, Seward J B, Tajik A J. Aortic valve sclerosis and aortic atherosclerosis: different manifestations of the same disease? Insights from a population-based study. *Journal of the American College of Cardiology* 2001; 38(3): 827-834.
- Akhyari P, Kamiya H, Gwanmesia P, Aubin H, Tschierschke R, Hoffmann S, Karck M, Lichtenberg A. In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position. *European Journal Cardio-Thoracic Surgery* 2010; 38(5): 539-546.
- Assmann A, Akhyari P, Delfs C, Flogel U, Jacoby C, Kamiya H, Lichtenberg A. Development of a growing rat model for the in vivo assessment of engineered aortic conduits. *Journal of Surgical Research* 2012a; 176(2): 367-375.
- Assmann A, Benim A C, Gul F, Lux P, Akhyari P, Boeken U, Joos F, Feindt P, Lichtenberg A. Pulsatile extracorporeal circulation during on-pump cardiac surgery enhances aortic wall shear stress. *Journal of Biomechanics* 2012b; 45(1): 156-163.
- Assmann A, Delfs C, Munakata H, Schiffer F, Horstkotter K, Huynh K, Barth M, Stoldt V R, Kamiya H, Boeken U, Lichtenberg A, Akhyari P. Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating. *Biomaterials* 2013; 34(25): 6015-6026.
- Baguneid M, Murray D, Salacinski H J, Fuller B, Hamilton G, Walker M, Seifalian A M. Shear-stress preconditioning and tissue-engineering-based paradigms for generating arterial substitutes. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2004; 39(Pt 2): 151-157.
- Ballermann B J. Adhesion and differentiation of endothelial cells by exposure to chronic shear stress: a vascular graft model. *Blood Purification* 1995; 13(3-4): 125-134.
- Ballermann B J, Dardik A, Eng E, Liu A. Shear stress and the endothelium. *Kidney International Supplements* 1998; 67: S100-S108.
- Barratt-Boyes B G. A method for preparing and inserting a homograft aortic valve. *British Journal of Surgery* 1965; 52(11): 847-856.
- Baudet E M, Puel V, McBride J T, Grimaud J P, Roques F, Clerc F, Roques X, Laborde N. Long-term results of valve replacement with the St. Jude Medical prosthesis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1995; 109(5): 858-870.

- Baum J, Duffy H S. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2011; 57(4): 376-379.
- Bloch O, Erdbrugger W, Volker W, Schenk A, Posner S, Konertz W, Dohmen P M. Extracellular matrix in deoxycholic acid decellularized aortic heart valves. *Medical Science Monitor* 2012; 18(12): BR487-BR492.
- Budd J S, Allen K E, Bell P R, James R F. The effect of varying fibronectin concentration on the attachment of endothelial cells to polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Journal of Vascular Surgery* 1990; 12(2): 126-130.
- Burgazli K M, Mericliler M, Erenturk S, Polat Z P, Atmaca N. Early postoperative hemodynamic performances of stented versus stentless aortic xenografts in aortic valve replacement in elderly patients: a comparative study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2013; 17(14): 1894-1900.
- Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, Hilfiker A, Mertsching H, Leyh R, Breyman T, Kallenbach K, Maniuc L, Batrinac A, Repin O, Maliga O, Ciubotaru A, Haverich A. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation* 2006; 114(1 Suppl): I132-I137.
- Cebotari S, Tudorache I, Ciubotaru A, Boethig D, Sarikouch S, Goerler A, Lichtenberg A, Cheptanaru E, Barnaciuc S, Cazacu A, Maliga O, Repin O, Maniuc L, Breyman T, Haverich A. Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. *Circulation* 2011; 124(11 Suppl): S115-S123.
- Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, Hilfiker A, Dorfman S, Ternes W, Haverich A, Lichtenberg A. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artificial Organs* 2010; 34(3): 206-210.
- Cha M C, Purslow P P. The activities of MMP-9 and total gelatinase respond differently to substrate coating and cyclic mechanical stretching in fibroblasts and myoblasts. *Cell Biology International* 2010; 34(6): 587-591.
- Clarke D R, Campbell D N, Hayward A R, Bishop D A. Degeneration of aortic valve allografts in young recipients. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1993; 105(5): 934-941.
- Davie E W. Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 74(1): 1-6.
- De Kerchove L, Glineur D, El K G, Noirhomme P. Stentless valves for aortic valve replacement: where do we stand? *Current Opinion in Cardiology* 2007; 22(2): 96-103.
- De Valence S., Tille J C, Mugnai D, Mrowczynski W, Gurny R, Moller M, Walpoth B H. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. *Biomaterials* 2012; 33(1): 38-47.

- De Visscher G., Mesure L, Meuris B, Ivanova A, Flameng W. Improved endothelialization and reduced thrombosis by coating a synthetic vascular graft with fibronectin and stem cell homing factor SDF-1alpha. *Acta Biomaterialia* 2012; 8(3): 1330-1338.
- ESC/EACTS Guidelines. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). 2012. The Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS).
- Flameng W, De V G, Mesure L, Hermans H, Jashari R, Meuris B. Coating with fibronectin and stromal cell-derived factor-1alpha of decellularized homografts used for right ventricular outflow tract reconstruction eliminates immune response-related degeneration. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2013.
- Fluß F. Wie entsteht aus einem Rinderherzbeutel eine Herzklappe für einen Patienten? *Focus MUL - Universität zu Lübeck* . 2007.
- Funkat A K, Beckmann A, Lewandowski J, Frie M, Schiller W, Ernst M, Hekmat K, Gummert J F, Mohr F W. Cardiac surgery in Germany during 2011: a report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon* 2012; 60(6): 371-382.
- Gendler E, Gendler S, Nimni M E. Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis. *Journal of Biomedical Materials Research* 1984; 18(7): 727-736.
- Golczyk K, Kompis M, Englberger L, Carrel T P, Stalder M. Heart valve sound of various mechanical composite grafts, and the impact on patients' quality of life. *The Journal of Heart Valve Disease* 2010; 19(2): 228-232.
- Grauss R W, Hazekamp M G, Van V S, Gittenberger-de Groot A C, DeRuiter M C. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2003; 126(6): 2003-2010.
- Green M K, Walsh M D, Dare A, Hogan P G, Zhao X M, Frazer I H, Bansal A S, O'Brien M F. Histologic and immunohistochemical responses after aortic valve allografts in the rat. *The Annals of Thoracic Surgery* 1998; 66(6 Suppl): S216-S220.
- Griese D P, Ehsan A, Melo L G, Kong D, Zhang L, Mann M J, Pratt R E, Mulligan R C, Dzau V J. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 2003; 108(21): 2710-2715.
- Grinnell F. Fibronectin and wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry* 1984; 26(2): 107-116.
- Gwanmesia P, Ziegler H, Eurich R, Barth M, Kamiya H, Karck M, Lichtenberg A, Akhyari P. Opposite effects of transforming growth factor-beta1 and vascular

- endothelial growth factor on the degeneration of aortic valvular interstitial cell are modified by the extracellular matrix protein fibronectin: implications for heart valve engineering. *Tissue Engineering Part A* 2010; 16(12): 3737-3746.
- Haase S C, Rovak J M, Dennis R G, Kuzon W M, Jr., Cederna P S. Recovery of muscle contractile function following nerve gap repair with chemically acellularized peripheral nerve grafts. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 2003; 19(4): 241-248.
- Harken D E. Heart valves: ten commandments and still counting. *The Annals of Thoracic Surgery* 1989; 48(3 Suppl): S18-S19.
- Harken D E, Soroff H S. Partial and complete prostheses in aortic insufficiency. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1960; 40: 744-762.
- Herold G. *Innere Medizin*. 2012.
- Hoekstra F, Knoop C, Vaessen L, Wassenaar C, Jutte N, Bos E, Bogers A, Weimar W. Donor-specific cellular immune response against human cardiac valve allografts. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1996; 112(2): 281-286.
- Hogan P, Duplock L, Green M, Smith S, Gall K L, Frazer I H, O'Brien M F. Human aortic valve allografts elicit a donor-specific immune response. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1996; 112(5): 1260-1266.
- Huynh K C, Stoldt V R, Scharf R E. Contribution of distinct platelet integrins to binding, unfolding, and assembly of fibronectin. *Biological Chemistry* 2013; 394(11): 1485-1493.
- Kaltenbach M. *Herz Kreislauf kompakt: Eine konzentrierte Darstellung der Herz- und Gefäßerkrankungen für Ärzte, Studenten und Mitarbeiter in Pflege und Medizintechnik*. 2006.
- Kaplan M H, Bolande R, Rakita L, Blair J. Presence of Bound Immunoglobulins and Complement in the Myocardium in Acute Rheumatic Fever — Association with Cardiac Failure. *The New England Journal of Medicine* 1964; 271: 637-645.
- Kasimir M T, Rieder E, Seebacher G, Nigisch A, Dekan B, Wolner E, Weigel G, Simon P. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *The Journal of Heart Valve Disease* 2006; 15(2): 278-286.
- Kim W G, Park J K, Park Y N, Hwang C M, Jo Y H, Min B G, Yoon C J, Lee T Y. Tissue-engineered heart valve leaflets: an effective method for seeding autologous cells on scaffolds. *The International Journal of Artificial Organs* 2000; 23(9): 624-628.
- Knight R L, Wilcox H E, Korossis S A, Fisher J, Ingham E. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers* 2008; 222(1): 129-143.

- Kuwada S K, Li X. Integrin alpha5/beta1 mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation. *Molecular Biology of the Cell* 2000; 11(7): 2485-2496.
- Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-926.
- Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Suprunov M, Tudorache G, Goerler H, Park J K, Hilfiker-Kleiner D, Ringes-Lichtenberg S, Karck M, Brandes G, Hilfiker A, Haverich A. Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation* 2006; 114(1 Suppl): I559-I565.
- Meyer S R, Chiu B, Churchill T A, Zhu L, Lakey J R, Ross D B. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. *Journal of Biomedical Materials Research* 2006; 79(2): 254-262.
- Meyer S R, Nagendran J, Desai L S, Rayat G R, Churchill T A, Anderson C C, Rajotte R V, Lakey J R, Ross D B. Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2005; 130(2): 469-476.
- Mol A, Driessen N J, Rutten M C, Hoerstrup S P, Bouten C V, Baaijens F P. Tissue engineering of human heart valve leaflets: a novel bioreactor for a strain-based conditioning approach. *Annals of Biomedical Engineering* 2005; 33(12): 1778-1788.
- Murtra M. The adventure of cardiac surgery. *European Journal Cardio-Thoracic Surgery* 2002; 21(2): 167-180.
- O'Brien M F, Harrocks S, Stafford E G, Gardner M A, Pohlner P G, Tesar P J, Stephens F. The homograft aortic valve: a 29-year, 99.3% follow up of 1,022 valve replacements. *The Journal of Heart Valve Disease* 2001; 10(3): 334-344.
- O'Brien M F, Stafford E G, Gardner M A, Pohlner P G, Tesar P J, Cochrane A D, Mau T K, Gall K L, Smith S E. Allograft aortic valve replacement: long-term follow-up. *The Annals of Thoracic Surgery* 1995; 60(2 Suppl): S65-S70.
- Ott M J. Shear stress-conditioned, endothelial cell-seeded vascular grafts: improved cell adherence in response to in vitro shear stress. *Surgery* 1995; 117(3): 334-339.
- Pankov R, Yamada K M. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* 2002; 115(Pt 20): 3861-3863.
- Paulin D. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research* 2004; 301(1): 1-7.
- Poggianti E, Venneri L, Chubuchny V, Jambrik Z, Baroncini L A, Picano E. Aortic valve sclerosis is associated with systemic endothelial dysfunction. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2003; 41(1): 136-141.

- Ramalanjaona G R, Kempczinski R F, Ogle J D, Silberstein E B. Fibronectin coating of an experimental PTFE vascular prosthesis. *Journal of Surgical Research* 1986; 41(5): 479-483.
- Rieder E, Seebacher G, Kasimir M T, Eichmair E, Winter B, Dekan B, Wolner E, Simon P, Weigel G. Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells. *Circulation* 2005; 111(21): 2792-2797.
- Ross D N. Evolution of the homograft valve. *The Annals of Thoracic Surgery* 1995; 59(3): 565-567.
- Rotmans J I, Heyligers J M, Stroes E S, Pasterkamp G. Endothelial progenitor cell-seeded grafts: rash and risky. *Canadian Journal of Cardiology* 2006; 22(11): 929-932.
- Sadler J E, Matsushita T, Dong Z, Tuley E A, Westfield L A. Molecular mechanism and classification of von Willebrand disease. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 74(1): 161-166.
- Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, Konig K, Riemann I, Halbhuber K J, Wahlers T, Stock U A. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *Journal of Structural Biology* 2003; 143(3): 201-208.
- Schmitt-Graff A, Desmouliere A, Gabbiani G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Archiv* 1994; 425(1): 3-24.
- Shaddy R E, Hunter D D, Osborn K A, Lambert L M, Minich L L, Hawkins J A, McGough E C, Fuller T C. Prospective analysis of HLA immunogenicity of cryopreserved valved allografts used in pediatric heart surgery. *Circulation* 1996; 94(5): 1063-1067.
- Shan L, Saxena A, McMahon R, Wilson A, Newcomb A. A systematic review on the quality of life benefits after aortic valve replacement in the elderly. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2013; 145(5): 1173-1189.
- Shi Y, O'Brien J E, Fard A, Mannion J D, Wang D, Zalewski A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* 1996; 94(7): 1655-1664.
- Shimada T, Nishibe T, Miura H, Hazama K, Kato H, Kudo F, Murashita T, Okuda Y. Improved healing of small-caliber, long-fibril expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts by covalent bonding of fibronectin. *Surgery Today* 2004; 34(12): 1025-1030.
- Simon P, Kasimir M T, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *European Journal Cardio-Thoracic Surgery* 2003; 23(6): 1002-1006.

- Smith J A, Westlake G W, Mullerworth M H, Skillington P D, Tatoulis J. Excellent long-term results of cardiac valve replacement with the St Jude Medical valve prosthesis. *Circulation* 1993; 88(5 Pt 2): II49-II54.
- Statistisches Bundesamt Wiesbaden. Todesursachen in Deutschland. 2011.
- Steer A C, Carapetis J R. Prevention and treatment of rheumatic heart disease in the developing world. *Nature Reviews Cardiology* 2009; 6(11): 689-698.
- Stewart B F, Siscovick D, Lind B K, Gardin J M, Gottdiener J S, Smith V E, Kitzman D W, Otto C M. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *Journal of the American College of Cardiology* 1997; 29(3): 630-634.
- Teebken O E, Wilhelmi M, Haverich A. Tissue engineering for heart valves and vascular grafts. *Chirurg* 2005; 76(5): 453-466.
- Tschierschke R. Evaluation verschiedener Dezellularisierungsprotokolle an ovinen Aortenklappen. 2010.
- Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, Kirsch L, Hurschler C, Hilfiker A, Haverich A, Lichtenberg A. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *The Journal of Heart Valve Disease* 16[5], 567-573. 2007.
- Vaheri A. Fibronectin (cold-insoluble globulin): role in defence. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1980; 110(40): 1437-1440.
- Welters M J, Oei F B, Witvliet M D, Vaessen L M, Cromme-Dijkhuis A H, Bogers A J, Weimar W, Claas F H. A broad and strong humoral immune response to donor HLA after implantation of cryopreserved human heart valve allografts. *Human Immunology* 2002; 63(11): 1019-1025.
- Yacoub M, Rasmi N R, Sundt T M, Lund O, Boyland E, Radley-Smith R, Khaghani A, Mitchell A. Fourteen-year experience with homovital homografts for aortic valve replacement. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1995; 110(1): 186-193.
- Yang G, Li H, Tang G, Wu L, Zhao K, Cao Q, Xu C, Wang R. Increased neointimal formation in cystathionine gamma-lyase deficient mice: role of hydrogen sulfide in alpha5beta1-integrin and matrix metalloproteinase-2 expression in smooth muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2012; 52(3): 677-688.
- Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel H P, Schenke-Layland K, Harasztosi C, Hu S, Stock U A. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials* 2010; 31(9): 2549-2554.
- Zhou M, Liu Z, Wei Z, Liu C, Qiao T, Ran F, Bai Y, Jiang X, Ding Y. Development and validation of small-diameter vascular tissue from a decellularized scaffold coated with heparin and vascular endothelial growth factor. *Artificial Organs* 2009; 33(3): 230-239

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Artur Lichtenberg, für die Überlassung meines hochinteressanten Dissertationsthemas bedanken.

Zudem möchte ich dem Elsevier Verlag danken für die Erteilung der Druckgenehmigung bereits publizierter Abbildungen aus einer früheren Publikation unserer Arbeitsgruppe.

Ein ganz besonderer Dank geht an PD Dr. Alexander Assmann, meinen Projektbetreuer, Arbeitsgruppenleiter und Freund. Zu jeder Phase dieser Arbeit, von der Etablierung der histologischen Verfahren bis hin zur Korrektur der Dissertation stand er mir mit seinem umfangreichen Fachwissen und kreativen Ideen zur Seite. Auch für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Konduit-Implantationen möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Ich möchte mich ebenso bedanken bei PD Dr. Payam Akhyari, dem Leiter der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie. Seine anregenden Diskussionen und kompetente Unterstützung, auch außerhalb des Labors, haben maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön geht auch an Dr. Volker R. Stoldt und Herrn Khon Chan Huynh aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Uni Düsseldorf, durch deren Kollaboration bezüglich Bereitstellung des fluoreszierenden Fibronektins diese Arbeit erst möglich gemacht wurde.

Mein Dank gilt auch allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der experimentellen Chirurgie für die professionelle Einführung in die histologischen und molekulargenetischen Methoden dieser Arbeit. Vor allem Frau Dr. Mareike Barth, Frau Gisela Müller, Herr Jörn Hülsmann und Herr Dr. Hiroshi Munakata standen mir bei Fragen und Problemen immer zur Seite.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden und Freunden aus der Arbeitsgruppe „Regenerative Kardiovaskuläre Medizin“ bedanken. Kim, Kai, Franziska, Rike und Marc haben mir bei den Versuchen stets tatkräftig zur Seite gestanden – durch ihre Unterstützung wird mir die Zeit im Labor immer in positiver Erinnerung bleiben.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

09.03.15, Christofer Delfs