

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

**Evaluation eines detergenzienfreien Dezellularisationsverfahrens
zur Herstellung kardiovaskulärer Implantate**

Dissertation

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

vorgelegt von

Marc Struß

2018

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD. Dr. Assmann

Zweitgutachter: PD. Dr. Oberhuber

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Assmann, A., Struß, M., Schiffer, F., Heidelberg, F., Munakata, H., Timchenko, E. V., Timchenko, P. E., Kaufmann, T., Huynh, K., Sugimura, Y., Leidl, Q., Pinto, A., Stoldt, V. R., Lichtenberg, A., and **Akhyari**, P. (2017)
Improvement of the in vivo cellular repopulation of decellularized cardiovascular tissues by a detergent-free, non-proteolytic, actin-disassembling regimen. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017 Jan 11. doi: 10.1002/term.2271.

Zusammenfassung

Die derzeitigen Therapieoptionen für den Ersatz erkrankter Herzklappen weisen bedeutende Limitationen auf. Mechanische Herzklappen bedürfen einer lebenslangen Antikoagulation, biologische Herzklappen sind in ihrer Haltbarkeit begrenzt und erfordern gehäuft komplikationsreiche Zweitoperationen.

Die Gewebezucht (*Tissue Engineering*) von Herzklappen vermag diese Limitationen zu überwinden. Sie kann durch das Potential dieser Implantate zum Mitwachsen insbesondere jungen Patienten eine adäquate Therapie zukommen lassen. Herkömmliche Protokolle basieren zwecks effektiver Entfernung zellulärer Bestandteile häufig auf Detergenzien und proteolytischen Substanzen, denen jedoch Bedenken in Bezug auf Toxizität und Gewebestruktur entgegenstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Alternative ein detergenzien- und proteasen-freies, rein biologisch basiertes Dezellularisierungsregime untersucht. Als Ausgangswebe dienten Aortenkonduits der Spezies Ratte und der Spezies Schwein, für welche das Verfahren jeweils in umfangreichen Versuchsreihen optimiert wurde. Die Ergebnisse wurden mit denen aus Proben verglichen, welche über ein detergenzien- basiertes Standardverfahren dezellularisiert wurden.

Histologische Untersuchungen der behandelten Gewebe ergaben durchweg adäquate Zellfreiheit bei sehr gutem Erhalt der extrazellulären Matrix inklusive der luminalen Basalmembran. Der DNA-Gehalt der biologisch dezellularisierten Prothesen war deutlich geringer im Vergleich zum Standardverfahren (porcin: $0,019 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,004 \mu\text{g}/\text{mg}$ versus $0,174 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,014$ mit $p < 0,001$). β -Actin und β_2 -Mikroglobulin als Marker für intrazelluläre Proteine wurden effektiv aus allen Proben entfernt. Der Glykosaminoglykangehalt aller dezellularisierten Gewebe war deutlich reduziert, wobei das biologisch basierte Protokoll deutlich niedrigere Rest-Konzentrationen erbrachte (porcin: $113,84 \mu\text{g}/\text{g} \pm 9,11 \mu\text{g}/\text{g}$ versus $240,41 \mu\text{g}/\text{g} \pm 23,09 \mu\text{g}/\text{g}$ in nativen Geweben mit $p < 0,001$ und versus $182,39 \mu\text{g}/\text{g} \pm 23,39 \mu\text{g}/\text{g}$ in Detergenzien-behandelten Geweben mit $p = 0,099$). Der relative Kollagenanteil der Präparate war konsekutiv erhöht. In Zellkulturexperimenten mit humanen Nabelschnurvenenendothelzellen und konditioniertem Medium ließen sich nach Abschluss der Verfahren jeweils keine zytotoxischen Effekte durch die generierten

Gerüste feststellen. *In vitro* Rebesiedelungsversuche zeigten keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Wahl des Dezellularisierungsverfahrens.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass das verwendete, auf biologischen Substanzen basierende Dezellularisierungsverfahren eine gute Balance zwischen Azellularität und strukturellem Erhalt der extrazellulären Matrix kardiovaskulärer Klein- und Großtierprothesen erzielt, und daher eine weitere Evaluation des Verfahrens als Alternative zu herkömmlichen Dezellularisierungsprotokollen gerechtfertigt erscheint.

Zusammenfassung Englisch

The current therapy options for heart valve replacement have significant limitations. Mechanical valves require lifelong anticoagulation, bioprosthetic valves are limited in their duration and often require complicated replacement surgery.

The technique of Tissue Engineering of heart valves is a possibility to surpass these limitations. A tissue-engineered valve can also potentially grow with its host making an adequate therapy of young patients possible. Most common regimens used to create cell-free scaffolds are based on detergents and proteolytic substances raising concerns regarding toxicity and structural preservation of the tissue.

The present study evaluated an alternative detergent- and protease-free decellularization regimen (BIO). After being optimized specifically for each tissue, this new regimen was applied to rat aortic conduits and porcine aortic valve samples comparing it with a standard detergent-based decellularization regimen (DET).

Histological studies of the tissues treated with BIO showed an effective elimination of cells and preservation of the extracellular matrix including the basement membrane. The DNA content of the BIO group was significantly lower than in the DET group (porcine: $0.019 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0.004 \mu\text{g}/\text{mg}$ versus $0.174 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0.014$ with $p < 0.001$). Beta-actin and β_2 -microglobulin as markers of intracellular proteins were effectively removed from all samples. The glycosaminoglycan content of all decellularized samples was reduced with lower remaining concentrations in the BIO group (porcine: $113.84 \mu\text{g}/\text{g} \pm 9.11 \mu\text{g}/\text{g}$ versus $240.41 \mu\text{g}/\text{g} \pm 23.09 \mu\text{g}/\text{g}$ in native tissue with $p < 0.001$ and versus $182.39 \mu\text{g}/\text{g} \pm 23.39 \mu\text{g}/\text{g}$ in DET-treated tissue with $p = 0.099$). Consecutively, the relative collagen content was increased. In cell culture experiments with human umbilical vein endothelial cells with conditioned cell culture media, no toxic effects of the produced scaffolds were observed. In vitro cellular repopulation trials showed no difference between BIO and DET.

In summary, this study showed that the detergent-free decellularization regimen achieves a good balance between elimination of cells and structural preservation of the extracellular matrix in small and large animal heart valve prostheses. Hence,

further translational investigation of this procedure as an alternative to the existing methods is promising and justified.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	Lsg.	Lösung
Art.	Arteria	mM	Millimolar
Asc.	Ascendens	MV	Mittelwert
APS	Ammoniumperoxosulfat	NaN₃	Natriumazid
AV	Atrioventrikular	nM	Nanomolar
β₂-MG	β ₂ -Mikroglobulin	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Bidest.	Bidestillata	Prot.	Protokoll
BCA	Bichinonsäure	PSR	Pirco Sirius Red
BSA	Bovines Serum Albumin	PVDF	Polyvinylidenfluorid
CCS	Kupfersulfat Lösung	Rel.	Relativer
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol	Rpm	Rotationen pro Minute
DCA	Desoxycholsäure	RT	Raumtemperatur
Desc.	Descendens	SDS	Natriumdodecylsulfat
Dezell.	Dezellularisierung	SEM	Standardfehler
DMSO	Dimethylsulfoxid	SL	Semilunar
ECGM2	<i>Endothelial Cell Growth Medium II</i>	TBST	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
FCS	Fetales Kälberserum	TE	Tissue Engineering
FG	Fast Green	Tr.	Truncus
GAG	Glykosaminoglykan	U/min	Umdrehungen pro Minute
HE	Hämatoxylin-Eosin	VIC	<i>Valve interstitial cells</i>
HUVEC	Humane Nabelschnurendothelzellen		
EZM	Extrazelluläre Matrix		

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Erkrankungen der Herzklappen</i>	1
1.2 <i>Tissue engineerete Herzklappen</i>	4
1.3 <i>Strukturelle Vorgaben für bioartifizielle Herzklappen</i>	7
1.4 <i>Wahl des Herstellungsverfahrens für bioartifizielle Herzklappengerüste</i>	8
1.5 <i>Zielsetzung dieser Arbeit</i>	10
2. Material und Methoden	12
2.1 <i>Material</i>	12
2.1.1 <i>Chemiekalien</i>	12
2.1.2 <i>Antikörper</i>	14
2.1.3 <i>Gebrauchswaren</i>	14
2.1.4 <i>Geräte und Software</i>	15
2.1.5 <i>Organismen</i>	16
2.2 <i>Methoden</i>	17
2.2.1 <i>Explantation der Aortenkonduits</i>	17
2.2.2 <i>Dezellularisierungsprotokolle</i>	19
2.2.3 <i>Histologie</i>	25
2.2.4 <i>Relativer Kollagenanteil</i>	30
2.2.5 <i>DNA- Quantifizierung</i>	31
2.2.6 <i>Glykosaminoglykangehalt</i>	32
2.2.7 <i>Proteinanalyse</i>	34
2.2.8 <i>Zytotoxizitätstests</i>	37
2.2.9 <i>Rebesiedelungsversuche</i>	40
3. Ergebnisse	43
3.1 <i>Studien an Aortenkonduits der Spezies Ratte</i>	43
3.1.1 <i>Histologie und Immunhistologie</i>	43
3.1.2 <i>Relativer Kollagengehalt</i>	57
3.1.3 <i>Glykosaminoglykangehalt</i>	58
3.1.4 <i>DNA-Konzentration</i>	59
3.1.5 <i>Proteinanalyse über Western Blot</i>	60
3.2 <i>Studien an Aortenkonduits der Spezies Schwein</i>	61
3.2.1 <i>Histologie und Immunhistologie</i>	61
3.2.2 <i>Relativer Kollagengehalt</i>	66

3.2.3 Glykosaminoglykangehalt	67
3.2.4 DNA-Konzentration	68
3.2.5 Proteinanalyse über Western Blot.....	69
3.2.6 Zytotoxizitätstests	70
3.2.7 Rebesiedelungsversuche	71
4. Diskussion	73
4.1 <i>Diskussion der Methoden</i>	73
4.1.1 Wahl der Spenderspezies	73
4.1.2 Eingesetzte Dezellularisierungsprotokolle.....	75
4.1.3 Methoden zur Evaluation des Dezellularisierungserfolgs.....	77
4.2 <i>Diskussion der Ergebnisse</i>	80
4.2.1 Azellularität.....	80
4.2.2 Erhalt der extrazellulären Matrix.....	83
4.2.3 Zytokompatibilität	85
4.3 <i>Ausblick</i>	86
5. Literaturverzeichnis	89
6. Danksagung.....	96

1. Einleitung

1.1 Erkrankungen der Herzklappen

Die Prävalenz von mittelschweren bis schweren Herzklappenerkrankungen wird für die USA altersadaptiert auf 2,5% geschätzt [1]. Zu den möglichen Auslösern von Herzklappenerkrankungen gehören unter anderen degenerative Veränderungen, rheumatisches Fieber, Endokarditiden, Ischämien, Entzündungen sowie kongenitale Fehlbildungen [2]. Die Häufigkeit kongenitaler Fehlbildungen (Bicuspide Aortenklappenanlage, etc.) der Herzklappen wird auf 2% aller Lebendgeburten geschätzt, wobei von einer deutlich höheren Inzidenz auf Grund von nicht identifizierten subklinischen Verläufen ausgegangen wird [3].

Im Jahr 2014 wurden in Deutschland 31 000 Operationen auf Grund von Erkrankungen der Herzklappen durchgeführt. Eingriffe an den Herzklappen stellen somit nach Operationen der Koronarchirurgie die zweithäufigste Ursache für herzchirurgische Interventionen dar [4].

Meist sind die Herzklappen des linken Herzens betroffen. Erkrankungen der Aortenklappe sind am häufigsten gefolgt von Pathologien der Mitralklappen. Seltener treten Erkrankungen an der Pulmonal- und Trikuspidalklappe auf. Die Aortenklappenstenose und die Mitralklappeninsuffizienz machen dabei dreiviertel aller Erkrankungen aus [2, 5, 6].

Höhergradige Herzklappenerkrankungen stellen schwere Erkrankungen dar. Für die Aortenklappenstenose beispielsweise als häufigstes isoliertes Klappenvitium [6] ergab eine Studie aus Neuseeland nach Auftreten von Symptomatik ohne interventionelle Therapie eine Mortalität von 73% über einen Zeitraum von 34 Monaten [7]. Während die Aortenklappenstenose in den Anfangsstadien meist asymptomatisch bleibt, kommt es mit Progression der Erkrankung zur klinischen Manifestation in Form von Belastungsdyspnoe, Angina Pectoris bei Belastung, Schwindel, Synkopen sowie Zeichen der Herzinsuffizienz. In diesem Stadium ist der Herzklappenersatz die Therapie der Wahl [8].

Während in den Entwicklungsländern das rheumatische Fieber weiterhin ein großes Problem ist und die Hauptursache der Herzklappenerkrankungen darstellt, ist es in Europa nur noch für etwa 22% der Fälle verantwortlich. Mit etwa 63% aller

Fälle ist der Großteil der Erkrankungen in Europa auf degenerative Ursachen zurückzuführen [6, 9, 10].

Da das Auftreten degenerativer Veränderungen mit dem Alter ansteigt, wird auf Grund der zunehmenden Lebenserwartung weltweit bis ins Jahr 2050 ein Anstieg der notwendigen Eingriffe von derzeit etwa 300.000 auf 800.000 Eingriffe erwartet [11].

Vor dem Hintergrund der deutlich steigenden Fallzahlen rückt eine Optimierung der operativen therapeutischen Optionen in den Fokus. Die derzeitigen Standardtherapieoptionen umfassen Katheter-gestützte und offene Operationsverfahren. Es wird zwischen rekonstruktiven Techniken mit dem Versuch des Erhalts der körpereigenen Herzklappe und dem prothetischen Klappenersatz unterschieden [12].

Beim prothetischen Klappenersatz kommen aktuell mechanische und biologische Herzklappenprothesen zum Einsatz. Mechanische Herzklappenprothesen werden aus verschiedenen Kunststoffen oder Metallen hergestellt und zeichnen sich durch eine exzellente Haltbarkeit aus [13]. Bei biologischen Herzklappenprothesen handelt es sich meist um Glutaraldehyd- fixierte Klappen oder Perikard vom Schwein oder Rind mit einer limitierten Haltbarkeit. Die Quote für strukturelles Versagen derartiger Prothesen wird mit 10-30% nach 10 Jahren und 20-50% nach 15 Jahren angegeben [13]. Die häufigste Ursache für das Versagen der Prothesen stellt die Destruktion in Folge von Kalzifizierung dar [14]. Die Verwendung biologischer Herzklappenprothesen ist möglich, da eine vorherige Fixierung mittels Glutaraldehyd zu einer chemischen Stabilisierung führt und unter anderen über die Vernetzung von Kollagenen Antigene maskiert. Dies führt zu einer verminderten Antigenpräsentation und hat eine reduzierte Immunogenität zur Folge [14].

Beide Prothesenarten haben ihre spezifischen Nachteile. Während mechanische Herzklappenprothesen einer lebenslangen Antikoagulation bedürfen, ist dies bei biologischen Herzklappenprothesen nicht notwendig [8, 13, 15].

Die lebenslange Antikoagulation geht neben Einschränkungen im Alltag der Patienten über die gesamte Lebenszeit mit einem erheblichen Risiko für hämorrhagische Komplikationen einher. Für mechanische Herzklappenprothesen wird die gesamte Komplikationshäufigkeit mit 0,7–3,5% pro Patientenjahr

angegeben [16]. Die Häufigkeit von thromboembolischen Komplikationen von biologischen und mechanischen Klappen ist vergleichbar. Beim Einsatz von biologischen Klappenprothesen sind auf Grund von strukturellem Versagen der Prothesen insbesondere bei jüngeren Patienten häufiger Zweitoperationen notwendig [17, 18]. Eine weitere gefürchtete Komplikation ist das Auftreten von Endokarditiden, welche beide Prothesenformen betreffen kann [19].

Für Katheter-gestützte Verfahren existieren derzeit keine mechanischen Prothesen. Dies ist unter anderen einer der Gründe für den vermehrten Einsatz biologischer Klappen in den letzten Jahren [20, 21]. Weitere Gründe für die vermehrte Implantation biologischer Prothesen sind sowohl deren strukturelle und funktionelle Optimierung, als auch die Tatsache, dass ein bei einem Bioklappenträger evtl. notwendiger Rezidiv-Klappenersatz mittlerweile auch in höherem Alter in der Regel sicher durchgeführt werden kann – entweder operativ oder interventionell [22, 23]. Somit werden vielerorts biologische Prothesen bevorzugt, um so die mit dem Alter inzidentell zunehmenden Nebenwirkungen einer effektiven oralen Antikoagulation mit hochdosierten Kumarinderivaten vermeiden zu können. Ausgenommen von diesem Vorgehen sind natürlich junge Patienten, die bei der Wahl eines biologischen Implantats noch mehrere Rezidiv-Operationen im Laufe ihres Lebens erwarten würden [17, 18].

Die Klappenrekonstruktion als wichtige Alternative ist oft auf Grund einer zu weit fortgeschrittener Destruktion der Herzklappe nicht anwendbar [24, 25]. Beispielsweise bei degenerativen Mitralklappenerkrankungen zeigen sich jedoch die Vorteile dieser Technik. Neben einer geringeren operativen Mortalität und einer beschriebenen besseren postinterventionellen linksventrikulären Funktion, kommt es insbesondere zu einem selteneren Auftreten von Blutungen, Thromboembolien und Endokarditiden [26-28].

Eine Besonderheit stellt das 1962 von Dr. Donald Ross vorgestellte Ross-Verfahren dar. Hierbei wird die Aortenklappe durch die patienteneigene Pulmonalklappe ersetzt und in die Pulmonalklappenposition ein *Homograft* implantiert [29]. Die Vorteile dieses Verfahrens sind unter anderen die fehlende Notwendigkeit einer Antikoagulation sowie ein gewisses Wachstumspotential der Pulmonalklappe in Aortenposition, was diese Operation insbesondere für junge

Patienten zu einer bedeutenden Option macht. Ferner besitzen Homografts sehr gute hämodynamische Eigenschaften mit der Wiederherstellung eines normalen Blutflusses in die Koronarostien [30-32].

Die Nachteile des Ross-Verfahrens liegen neben einem erhöhten operativen Risiko in der Notwendigkeit von erneuten Operationen im Verlauf, vor allem auf Grund von Dilatationen im Bereich des Autografts sowie dem Versagen des Homografts in der Pulmonalklappenposition [33]. Die Rate für das Versagen des Autografts wird mit 1,15% pro Jahr angegeben, die Rate für das Versagen des Homografts mit 0,91% pro Jahr [34, 35]. Auch ist die Anzahl der verfügbaren Homografts durch einen Mangel an Spendern begrenzt [32].

Die ideale Herzklappenprothese muss folgendes Eigenschaftenprofil besitzen: Unbegrenzte Haltbarkeit bei Regenerationsfähigkeit und Wachstumsfähigkeit, Thrombogenitätsresistenz, Infektionsresistenz, keine Abstoßung durch das Immunsystem des Empfängers, keine Hämolyseinduktion, keine Prothesengeräusche, Erhalt der physiologischen Hämodynamik, kompletter und schneller Klappenschluss ohne Regurgitation, einfache und sichere Implantationstechnik sowie eine weite Verfügbarkeit [12].

Legt man diese Eigenschaften als Maßstab an, sind Herzklappenerkrankungen heute zwar gut therapierbar, keines der derzeit verfügbaren Verfahren ist jedoch auf Grund der beschriebenen jeweiligen Limitationen ideal. In besonderem Maße ist die Therapie von jungen Patienten auf Grund der besonderen Anforderungen eines wachsenden Organismus weiterhin problematisch. Neben dem Risiko von Komplikationen über einen sehr langen Zeitraum, besitzt keine der gängigen Klappenprothesen Mitwachskapazität. Alternative Verfahren wie die Ross-Operation bedürfen vielfach im Verlauf erneute Eingriffe [24, 36].

1.2 Tissue engineeringe Herzklappen

Das *Tissue engineering* (TE) ist ein relativ junger Forschungsbereich der regenerativen Medizin, welcher die derzeitigen Limitationen der Standardtherapieoptionen potentiell zu überwinden vermag. Langer, R. und Vacanti, J. P. definierten das Tissue Engineering 1993 als ein interdisziplinäres Forschungsfeld mit dem Ziel der Generierung bioartifizieller Substitute, welche die

natürliche Funktion wiederherstellen, erhalten, verbessern oder ganze Organe ersetzen können [37].

Es werden derzeit im Wesentlichen zwei verschiedene Herangehensweisen der Gewebezucht von Herzklappen verfolgt. Zum einen die *in vitro* Zucht von Gewebe mit meist autologen Zellen auf dreidimensionalen Grundgerüsten, welche aus biologisch abbaubaren Polymeren, biologischen Substanzen wie Kollagenen oder dezellularisierten Allo- oder Xenografts bestehen. Zum anderen die *in vivo* Implantation von azellulären Gerüsten ohne vorherige Rebesiedelung [12, 38-40].

Die Kultivierung der *in vitro* besiedelten Gewebe erfolgt hierbei meist in einem Bioreaktor unter Einfluss definierter Reize, um eine Anpassung und Differenzierung der eingesetzten Zellen auf das Einsatzgebiet zu erreichen. Zum Einsatz kommen unter anderen CD 133⁺ Nabelschnurzellen, zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) oder mesenchymale Stammzellen [41-43].

Das Konzept der Implantation von azellulären Gerüsten *in vivo* bedient sich der spontanen Rebesiedelung der Implantate durch den Empfängerorganismus. Bei den Gerüsten handelt es sich meist um dezellularisierte Allo- oder Xenografts, es kommen jedoch auch synthetische Gerüste zum Einsatz [44-46] Die Verwendung von Xenografts kann jedoch Immunreaktionen gegen Bestandteile der EZM auch nach Dezellularisierung verursachen. So konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten zu einer immunologischen Antwort auf bovines Kollagen I,II und III kommen kann [47]. Darüberhinaus ist eine Infektion mit pathogenen Viren über das Xenograft denkbar. Die DNA von porcinen endogenen Retroviren (ERV) konnte in dezellularisierten Schweineherzklappen nachgewiesen werden, zu einer Infektion kam es jedoch im Tierversuch vom Schwein auf das Schaf nicht [48]. Auch die Übertragung von Prionenerkrankungen ist denkbar und sollte weiter erforscht werden [49, 50]. Durch den Einsatz von Allografts lassen sich viele dieser Problematiken vermeiden, die begrenzte Verfügbarkeit schränkt jedoch eine breite Verwendung ein [32, 51].

Durch eine biotechnologische Modifikation der verwendeten Gerüste kann darüber hinaus das *in vivo* Rebesiedelungsverhalten beeinflusst werden. Beispielsweise führt die Beschichtung der Prothesengerüste mit kovalent gebundenem Fibronectin im Rattenmodell zu einer deutlich vermehrten und beschleunigten

Rebesiedelung von dezellularisierten Aortenkonduits der Ratte [52]. Die schnelle Rebesiedelung ist insbesondere mit Hinblick auf die initiale Thrombogenität der Gerüste auf Grund des fehlenden Endothels von großer Bedeutung [53].

Einige Forschungsgruppen haben eindrucksvoll das Potential der Technologien des *Tissue Engineerings* in verschiedenen Anwendungsbereichen aufzeigen können. So gelang der Gruppe um Macchiarini et al. 2008 die Generierung einer vollständigen *tissue engineerter* Trachea und die Transplantation dieser in den linken Hauptbronchus einer Patientin mit fortgeschrittener Bronchomalazie. In Verlaufskontrollen über fünf Jahre nach Implantation zeigte sich das Transplantat strukturell intakt, gut vaskularisiert und mit typischen respiratorischen Epithel besiedelt [54, 55].

Ein weiteres Beispiel ist die Gruppe um Atala A et al., welche sieben Patienten im Alter zwischen 4 und 19 Jahren bioartifizielle Blasen transplantierte. Hierfür wurden zunächst über eine Biopsie der erkrankten Blase autologe Urothel- und Muskelzellen gewonnen und diese in Kultur genommen. Im Anschluss wurde ein biologisch abbaubares Gerüst (*Scaffold*) aus Kollagen und Polyglycolsäure mit den kultivierten Zellen besiedelt und erfolgreich implantiert [56].

Auch der Einsatz des *Tissue Engineerings* zum Herzklappenersatz zeigt neue vielversprechende Möglichkeiten auf. Sowohl im Tierversuch als auch in der klinischen Anwendung zeigten dezellularisierte Aortenklappen- und Pulmonalklappenprothesen gute Eigenschaften [57-59]

Costa et al. implantierten 41 Patienten Allografts der Aortenklappe, welche zuvor mit einer 0,1% Natriumdodecylsulfat Lösung dezellularisiert worden waren. Bei insgesamt 4 Todesfällen war lediglich bei einem Patient eine Reoperation auf Grund von Mitralklappenversagen notwendig. Darüberhinaus trat über eine mittlere Beobachtungszeit von 19 Monaten im Mittel lediglich eine diskrete Kalzifikation auf. Eine Regurgitation über der Aortenklappe trat bei einem Patienten auf, der Durchmesser der Aortenwurzel blieb stabil. Die histologische Untersuchung des reoperierten Patienten zeigte eine gut erhaltene Wandstruktur der Aorta bei eingeschränkter Rebesiedelung durch den Empfängerorganismus [57].

In einer weiteren aktuellen klinischen Studie über den Zeitraum von 2008 bis 2014 wird von einer hannoverschen Forschungsgruppe berichtet, dass die Implantation dezellularisierter Herzklappenprothesen in 43 Patienten in Aortenposition bei unauffälligen hämodynamischen und klinischen Ergebnissen bisher keine Explantation der Prothesen notwendig machte [59].

In den letzten Jahren häuften sich jedoch vornehmlich bei pädiatrischen Patienten die Fälle von vorzeitigem Prothesenversagen dezellularisierter Xenografts in der Pulmonalklappenposition unter anderem auf Grund von Stenosierungen, Dilatation oder Pseudoaneurysmabildung der implantierten Konduits. Die histologische Analyse der entnommenen Prothesen ergab in einer Vielzahl der Fälle inflammatorische Prozesse einhergehend mit fibroproliferativen Vorgängen als Ursache für das Versagen. Ferner kam es nur zu einer eingeschränkten Rebesiedelung der Klappen [60-63].

Die Untersuchung einiger der verwendeten Klappen (Matrix P Plus, AutoTissue GmbH) vor der Implantation zeigte eine unzureichende Dezellularisierung der Prothesen bei deutlich sichtbaren Zellresiduen in der histologischen Auswertung [63]. Eine unzureichende Entfernung zellulärer Anteile in *Xenografts* wird als möglicher Auslöser von Inflammationsreaktionen und konsekutivem Prothesenversagen vermutet [64, 65]. Eine Optimierung der Dezellularisierungsverfahren ist folglich ein wichtiger Ansatz zur weiteren Verbesserung der Qualität der eingesetzten *tissue engineeren* Prothesen.

1.3 Strukturelle Vorgaben für bioartifizielle Herzklappen

Die optimalen bioartifiziellen Herzklappen erfüllen in der Theorie sämtliche Anforderung, welche an eine ideale Herzklappenprothese gestellt werden (siehe 1.1). Derartige Prothesen versuchen den natürlichen Aufbau der Herzklappen nachzuahmen [51]. Im Folgenden wird daher kurz die Anatomie dieser beschrieben.

Es wird grundsätzlich zwischen den Atrioventrikulärenklappen (AV-Klappe) und den Semilunarklappen (SL-Klappe) unterschieden. Die AV-Klappen befinden sich zwischen den Vorhöfen und Ventrikeln, die SL-Klappen zwischen den Ventrikeln und der Aorta bzw. dem Truncus pulmonalis. Die Extrazelluläre Matrix (EZM) ist

dreischichtig aufgebaut und besteht aus der Lamina Fibrosa, der Lamina Spongiosa und der Lamina Ventrikularis bzw. der Lamina Atrialis. Die Lamina Fibrosa befindet sich auf der ventrikulären Seite der AV-Klappen und auf der arteriellen Seite der SL-Klappen. Sie besteht hauptsächlich aus fibrillären Kollagen vom Typ I und III und ist die Basis der Zugfestigkeit der Herzklappen gegen einwirkende Drücke. Zwischen der Lamina Fibrosa und der Lamina Ventrikularis/Atrialis befindet sich die Lamina Spongiosa. Diese besteht aus Glykosaminoglykanen und lockeren Kollagenfasern und ist entscheidend für die Plastizität der Klappe. Die Ventrikularis/Atrialis ist wichtig für die Elastizität der Herzklappe. Sie besteht hauptsächlich aus dichten Elastinfasern und bringt die Klappe nach der Herzaktion zurück in ihre Ausgangsform [38, 66].

Die zellulären Anteile bestehen im Wesentlichen aus Endothelzellen, interstitiellen Klappenzellen (*Valve interstitial cells* (VIC)), Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Die Endothelzellschicht umgibt die Klappe und schützt sie unter anderem vor Schäden, Immunreaktionen und Degeneration. Die glatten Muskelzellen kommen in unterschiedlicher Anzahl ubiquitär im Gewebe der Herzklappe vor. VICs erhalten die EZM durch die Synthese von Proteinen, Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren. Sie haben ähnliche Eigenschaften wie glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Myofibroblasten kombiniert [38].

Die histologische Auswertung im Rahmen dieser Arbeit beurteilt insbesondere die Aspekte der morphologischen Azellularität sowie den Erhalt des typischen strukturellen Aufbaus der Herzklappen.

1.4 Wahl des Herstellungsverfahrens für bioartifizielle Herzklappengerüste

Das optimale Dezellularisierungsverfahren vermag die EZM zu erhalten und eine immunologische Antwort des Empfängers auf das transplantierte Gewebe zu verhindern. Gleichzeitig müssen die physiologischen Eigenschaften und die physikalische Resistenz erhalten bleiben. Auch die technische Durchführung sollte einfach und standardisiert möglich sein bei möglichst geringem materiellen Aufwand zur Wahrung der Wirtschaftlichkeit.

Der Erhalt der EZM ist neben dem direkten Einfluss auf die physikalischen

Eigenschaften der Prothesen insbesondere im Zusammenhang mit einer Rebesiedelung von Bedeutung. So spielen die Oberflächeneigenschaften eine wichtige Rolle bei der Adhäsion, der Proliferation und der Differenzierung von Stammzellen auf den generierten Gerüsten [67, 68]. Speziell der Interaktion zwischen den Zellen und den Proteinen der EZM scheint hierbei neben Wachstumsfaktoren, mechanischen Einflüssen und vielen weiteren eine wichtige Rolle zu zukommen [67, 69-71].

Es sind eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren zur Dezellularisierung von verschiedenen Geweben eingesetzt worden. Zur Entfernung zellulärer Anteile kamen hierbei neben chemischen und osmotischen Methoden enzymatische und mechanische Techniken oder eine Kombination dieser zum Einsatz [65].

Im Rahmen des kardiovaskulären TE werden vielfach detergenzien- und proteasen- basierte Verfahren verwendet [72]. Diese unspezifischen Substanzen greifen jedoch neben den zellulären Proteinen auch die Proteine der EZM an. Es konnte beispielweise gezeigt werden, dass es in Schweineherzklappen nach Exposition mit Natriumdodecylsulfat (SDS) zu einem Verlust und Fragmentierung von Kollagen kommt [73]. Darüber hinaus ist eine Vielzahl der eingesetzten Substanzen potentiell zytotoxisch. So führt SDS auch, sofern es in hohen Konzentrationen eingesetzt wird und die Dauer der Auswaschschritte unzureichend ist, zu einer Beeinträchtigung des Zellwachstums in *in vitro* Versuchen [74, 75].

Ferner zeigten detaillierte Untersuchungen der Proteinzusammensetzung equiner Karotiden nach Dezellularisierung über ein detergenzien- basiertes Verfahren trotz histologisch morphologischer Azellularität und einem geringen DNA-Gehalt den Verbleib von über 300 verschiedenen zellulären Proteinbestandteilen in den Proben. Nach xenogener Injektion von Bestandteilen dieser Matrizen in Mäusen kam es zu einer deutlichen Antikörperbildung. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die gängigen detergenzien- basierten Verfahren zelluläre Proteine nicht effektiv entfernen und diese Immunreaktionen des Empfängerorganismus hervorrufen können [76].

Die Arbeitsgruppe um Allison R. Gillies et al. beschrieb ein Verfahren mit guten Ergebnissen für die Dezellularisierung quergestreifter Muskulatur, welches auf die

Verwendung von Detergenzien und proteolytischen Substanzen verzichtet. Zum Einsatz kamen neben Latrunculin B und DNase I hochkonzentrierte ionische Lösungen [77]. Darüberhinaus demonstrierten J.M. Fishman, et al, dass sich dieses Verfahren auch zur Dezellularisierung von Larynxmuskulatur eignet [78].

Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Anwendung dieses Protokolls bei quergestreifter Muskulatur zu einer Abschwächung der Immunantwort führte. In einem *in vivo* Xenotransplantat-Modell kam es zu einer Polarisierung von Makrophagen hin zum M2 Typ und die Proliferation von T-Zellen war deutlich reduziert [79].

Bei Latrunculin B handelt es sich um ein Extrakt der *Latrunculia magnifica*, eine Spezies aus Gruppe der Schwämme, welches im Roten Meer vorkommt [80]. Das Latrunculin B greift das Zytoskelett durch aktive Zerstörung der Aktinfilamente an [81]. Diese Eigenschaft legt einen Einsatz zur Dezellularisierung von kardiovaskulären Geweben nahe. So zeichnet sich beispielsweise die glatte Muskulatur der Media der von Gefäßen durch einen hohen Anteil an Aktin aus [82].

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist die erstmalige Evaluation der Eignung des von Allison R. Gillies et al. beschriebenen Dezellularisierungsverfahrens für einen Einsatz auf dem Gebiet des kardiovaskuläre *Tissue Engineerings*. Es wird vermutet, dass der Verzicht auf proteolytische Substanzen und Detergenzien zu einer besseren Konservierung der Proteine der EZM führt.

Hierzu wurde im Rahmen dieser Studie zum einen die Wirksamkeit des Verfahrens auf porcine Aortenklappen und zum anderen die Wirksamkeit auf Aortenkonduits der Ratte untersucht. Es wurden sowohl histologische als auch molekularbiologische Techniken zur genauen Charakterisierung der generierten dezellulierten Prothesen angewandt. Darüberhinaus kamen Zellkulturstudien zur Detektion von Einflüssen der verwendeten Verfahren auf die Zellproliferation, die Zellvitalität und das Rebesiedelungsverhalten zum Einsatz.

Als Vergleichsgruppe dienten neben nativen, unbehandelten Gewebe Proben

welche ein in unserer Arbeitsgruppe gut etabliertes detergenzien- basiertes Dezellularisierungsverfahren auf Basis von SDS, Desoxycholsäure (DCA) und Natriumazid durchliefen [83, 84].

Da sich auf Grund der Größenunterschiede die anatomischen Verhältnisse im Großtiermodell im Vergleich zum Kleintiermodell unterscheiden, ist es notwendig, diese separat zu analysieren. Die Anwendung des Protokolls auf das Kleintier im Rahmen dieser Arbeit soll hierbei unter anderem die Grundlage zur vergleichenden Evaluation der Auswirkungen verschiedener Modifikationen der Prothesen auf deren Rebesiedelung und Degeneration nach Implantation liefern. Diese Untersuchungen werden in Folgeprojekten in dem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Modell der heterotopen Aortenkonduitimplantation im Rattenmodell vorgenommen. Die Evaluation der Auswirkungen auf porcine Herzklappen geschieht in der vorliegenden Studie im Hinblick auf einen möglichen Einsatz als Xenotransplantat im Menschen. In diesem Zusammenhang ist das Großtiermodell vielfach zur Evaluation von diversen Herzklappenprothesen herangezogen worden und eignet sich daher auf Grund der gegebenen Vergleichbarkeit in besonderem Maße als Versuchsmodell [44, 85, 86].

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Merck KGa, Art.-Nr.: 1.00013.2500
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth, Art.-Nr.: A515.1
Alcianblau	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: A5268-10G
Ammoniumperoxosulfat	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: A3678-25G
Bichinonsäure	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: B9643-1L
Blyscan Glycosaminoglycan Assay	BioColor, Art.-Nr.: B1000
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: A7906-100G
Brilliant Crocein R	Chroma/Waldeck, Art.-Nr.: 1B-109
Calcein/Ethidiumbromid	Invitrogen Corp., Art.-Nr.: L3224
Cystein HCL	Carl Roth, Art.-Nr.: 3468.2
DEMEM + GlutaMAX™-I	Gibco, Art.-Nr.: 21885
Desoxycholsäure (DCA)	Amresco, Art.-Nr.: 0613
Deoxyribonuclease I	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 1001154684
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher Scientific, Art.-Nr.: 85190
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 236489-100G
Eosin B	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 861006-100G
Endothelial Cell Growth Medium 2	Promo Cell, Art.-Nr.: C-22211
Essigsäure (Eisessig), 100%	Merck KGaA, Art.-Nr.: 1.00066.1000
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 236489-100G
Fast Green	Merck KGaA, Art.-Nr.: 104022
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: F7524
Formaldehyd-Lösung, 37%	NeoLab, Art.-Nr.: 4025.1000
Glycin	Merck, Art.-Nr.: 104201
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: H3136-25G
Histoclear®	Nationaldiagnostics Art.-Nr.: HS-200
Jod	Carl Roth, Art.-Nr.: 7935.1

Jung Einbettmedium	Leica, Art.-Nr.: 020108926
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Art.-Nr.: 1049360500
Kaliumiodid	Carl Roth, Art.-Nr.: 8491.1
Kollagen	Corning, Art.-Nr.: 354236
Kupfersulfat Lösung	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: C2284
Laemmli Puffer	Bio-Rad, Art.-Nr.: #1610747
Latrunculin B	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: L5288-1MG
L-Glutamin	Gibco, Art.-Nr.: 25030081
Methanol	Carl Roth, Art.-Nr.: 4627.1
Natriumacetat	Merck KGaA, Art.-Nr.: 1062680250
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth, Art.-Nr. K305.2
Natrium EDTA	Carl Roth, Art.-Nr.: 8043.2
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth, Art.-Nr.: CN30.2
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Art.-Nr.:1064621000
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: S-1648
<i>PageRuler</i> [™]	Thermo Fisher Scientific, Art.-Nr.: 26619
Papain	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: P3125
PBS Fertiglösung	Gibco, Art.-Nr.: 14190-094
PBS Tabletten	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 79382-50TAB
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Art.-Nr.: 15140
Phosphorwolframsäure Hydrat	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 79690-100G
Picro Sirius Red	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 365548-25G
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 101158002
PP-Röhrchen,steril (50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Art.-Nr.: 227261
Proteinase K	Qiagen, Art.-Nr.: 19131
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Art.-Nr.: 51304
Roti®-Histofix 4%	Carl Roth, Art.-Nr.: P087.3
Roti®-Histokitt II (Einschlussmittel)	Carl Roth, Art.-Nr.: T160.1
Saffron du Gatinais	Chroma/Waldeck, Art.-Nr.: 5A-394
Salzsäure, 37%	Merck KGaA, Art.-Nr.: 1.00317.1000

Säurefuchsin	Chroma/Waldeck, Art.-Nr.:1B-525
Shandon Gill 3 Hematoxylin	Thermo Scientific, Art.-Nr.: 6765009
SuperSignal™ MW Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific: Art.-Nr.: 84785
<i>SuperSignal™ West Pico Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific: Art.-Nr.: 34080
<i>SuperSignal™ West Femto Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific: Art.-Nr.: 34095
TEMED	Bio-Rad, Art.-Nr.: #161081
Tissue-Tek® (Gefriermedium)	VWR, Art.-Nr.: 25608-930
Tris Base	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: T1503
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: X100
Trypanblau, 0,5%	Biochrom AG, Art.-Nr.: 6323
Trypsin/EDTA	Gibco, Art.-Nr.: 25-200-056
Tween 20	Merck, Art.-Nr.: 655205
Vectashield® mit DAPI	Vector Laboratories, Art.-Nr.: H-1200
Xylol	VWR Int. GmbH, Art.-Nr.: 28973.328

2.1.2 Antikörper

Primärantikörper:

Kaninchen anti-Kollagen IV	Abcam, Art.-Nr.: ab 6586
Kaninchen anti-β2-Mikroglobulin	Abcam, Art.-Nr.: ab 75853
Kaninchen anti-β-Actin	Cell Signaling Technology, Art.-Nr.: 4967

Sekundärantikörper:

Alexa Fluor© 546 anti-Kaninchen	Life Technologies, Art.-Nr.: Z25304
Kaninchen anti-Kaninchen IgG	Promega, Art.-Nr.: W4011

2.1.3 Gebrauchswaren

Abdecktücher (steril)	Paul Hartmann AG
Chirurgische Instrumente	Aesculap AG
Deckgläser	Engelbrecht GmbH
Injektionskanülen	B. Braun Melsungen AG

Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf AG
Objektträger	Paul-Marienfeld GmbH
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH
Skalpell (steril)	Feather
Spritzen	B. Braun Melsungen AG
Spritzenvorsatzfilter	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Vierkant-Glasreaktionsgefäße	Duran Group GmbH
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One GmbH
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturplatten	Starlab GmbH

2.1.4 Geräte und Software

Accu-jet pro (Pipettierhilfe)	Brand Tech Scientific
BioPhotometer Plus (Photometer)	Eppendorf AG
Braun Sonic 125 (Sonifizierungssond)	B. Braun Melsungen AG
Electrophoresis Power Supply 301	Amersham Pharmacia Biotech
EpiChemie II Darkroom	UPV BioImaging Systems
GFL 2102 (Wasserdestilliergerät)	Gesellschaft für Labortechnik mbH
Graphpad Prism (Statistikprogramm)	GraphPad Software
Heraeus FL B12 (Brutschrank)	Thermo Fisher Scientific
Heraeus Megafuge (Zentrifuge)	Thermo Fisher Scientific
Herasafe KS 18 (Sterilbank)	Thermo Fisher Scientific
Image J v. 1.46	USA National Institutes of Health
Kompaktschüttler KS 15 A (Schüttler)	Edmund Buehler GmbH
Kryo-Mikrotom	Leica Microsystems
Leica Application Suite V3.7 (Software)	Leica Microsystems
Leica DFC 425 C (Mikroskop Kamera)	Leica Microsystems
Leica DM IL LED (Inversmikroskop)	Leica Microsystems
Leica DM 2000 (Durchlichtmikroskop)	Leica Microsystems

Leica EL 6000 (externe Fluoreszenzanregung)	Leica Microsystems
ND-1000 NanoDrop	Thermo Fisher Scientific
Reichert-Jung 2035 (Mikrotom)	Leica Microsystems
Rollenmischer RS-TR 05	Phoenix Instrument
Sartorius BP 110 S (Waage)	Sartorius AG
Spektralphotometer DU 640	Beckmann
Systec VX-95 (Autoklav)	Systec GmbH
Thermomixer 5436 (Thermoblock)	Eppendorf AG
Tissue Flotation Bath	Firma Medite, Art.-Nr.: TFB 55
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Firma Bio-Rad
Universal 16 A Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
Vortex-Schüttler	VWR
XCell SureLock (Gelkammer)	Firma Thermo Scientific

2.1.5 Organismen

Sprague-Dawley Ratten	Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
HUVEC- Zellen	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Universitätsklinik Düsseldorf

2.2 Methoden

Die Bezugsquellen und Spezifikationen der angegebenen Materialien und Gerätschaften sind aus Gründen der Übersicht größtenteils bereits im Materialteil (siehe 2.1) dieser Arbeit aufgelistet.

2.2.1 Explantation der Aortenkonduits

Als Spendertiere dienten männliche, *ad libitum* mit Standardtiernahrung gefütterte Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 200-250 g, welche von der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf bezogen wurden. Die Tierversuche erfolgten unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes und im Rahmen des von der Bezirksregierung genehmigten Tierversuchsantrags (Aktenzeichen: 84-02.05.20.12.049).

Sämtliche Gewebeentnahmen wurden im Kleintieroperationssaal in den Laborräumlichkeiten des Institutes für experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Die Entnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen unter Verwendung eines Operationsmikroskops.

Explantation der Rattenaortenkonduits

Die Spendertiere wurden zur Organentnahme in einer CO₂-Kammer getötet. Umgehend nach dem Tod der Spendertiere, wurde zur Optimierung der Präparationsbedingungen die Bauchdecke eröffnet und die Aorta abdominalis sowie die Vena cava inferior dargestellt und durchtrennt. Der hierdurch provozierte Blutverlust in den Bauchraum verbesserte die Übersicht bei der Präparation des Aortenbogens. Im Anschluss wurde sternotomiert und der Thorax unter Zuhilfenahme eines Thoraxsperrers erweitert.

Es folgte die behutsame Thymektomie und die vorsichtige Präparation und Mobilisation des Aortenbogens und der thorakalen Aorta descendens (desc.). Das Perikard wurde eröffnet und das die Aorta umgebende perikardiale Fettgewebe entfernt. Die thorakale Aorta desc. wurde im Anschluss distal oberhalb des Diaphragmas durchtrennt und der Aortenbogen durch Ablösen der drei supraaortal abgehenden Äste weiter mobilisiert.

Nach Durchtrennung des Truncus (Tr.) pulmonalis sowie der unteren und oberen Hohlvene, wurde das Herz samt Aortenbogen und Aorta desc. aus dem Situs entfernt und in einer sterilen Petrischale weiter präpariert.

Reste des Tr. pulmonalis wurden entfernt und die Aortenklappenregion derart präpariert, dass diese lediglich von einem kleinen Myokardsaum umgeben war (siehe Abb. 1). Bis zum Beginn der Dezellularisierung wurden diese Aortenkonduits in sterilen PBS bei Raumtemperatur gelagert.

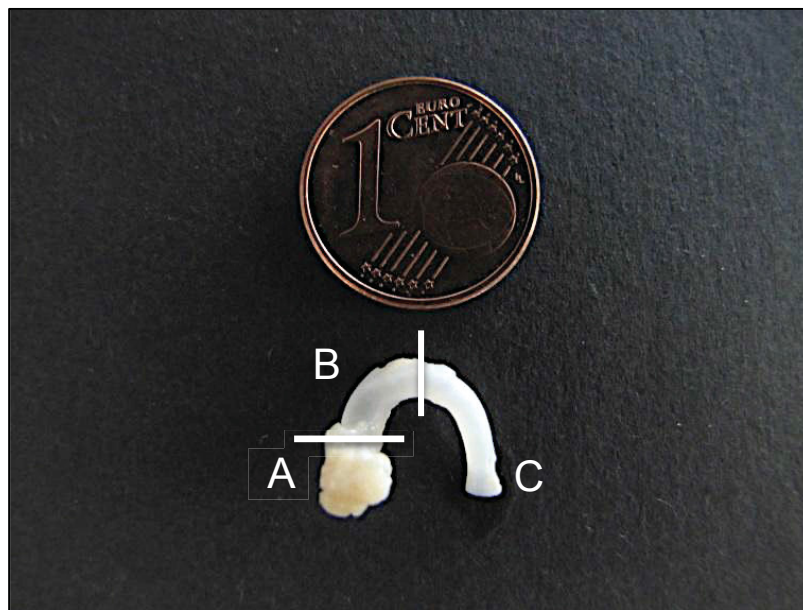


Abb.1: Makroskopische Aufnahme eines gemäß Protokoll 3 dezellularisierten Rattenaortenkonduits. A-C stellen die Unterteilung in die Regionen dar: (A) Aortenklappenregion, (B) Aorta asc., (C) Aorta desc..

Präparation der porcinen Aortenkonduits

Die Schweineherzen wurden freundlicherweise von der Willy Siemes und Sohn GmbH & Co. KG in Viersen zur Verfügung gestellt. Diese wurden unmittelbar nach dem Schlachten auf Eis gekühlt und in die Laborräumlichkeiten transportiert. Gewebe, welche für molekularbiologische Untersuchungen als Nativkontrollgruppen geplant waren, wurden vor Ort am Schlachthof exzidiert und in flüssigen Stickstoff gefroren transportiert.

Ziel der weiteren Präparation war es, ein Präparat zu erhalten, welches aus der Aortenwurzel mit den intakten Taschenklappen und dem Beginn der Aorta ascendens (asc.) bestand. Hierfür wurde die Aorta auf wenige Zentimeter gekürzt und der vielfach mit der Aorta asc. verwachsene Tr. pulmonalis vorsichtig von dieser getrennt. Es folgte die Eröffnung des rechten Herzhohes und die Identifikation der Klappenebene. Nachdem dies erfolgt war, wurde die Aortenwurzel durch Inzision der umliegenden Strukturen mobilisiert und vom übrigen Herzen abgetrennt.

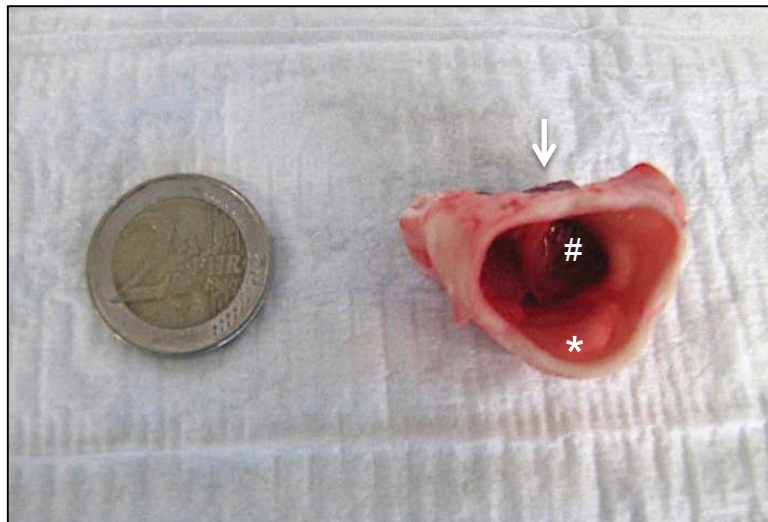


Abb. 2: Makroskopische Aufnahme eines porcinen Aortenkonduits nach Präparation. (#) Aortenklappenebene; (*) Aortenwurzel; mit (Pfeil) markiert Myokardreste.

Im Folgenden wurde das Aortenkonduit so weit wie möglich von Myokardresten befreit (siehe Abb. 2). Als abschließender Schritt wurde die Unversehrtheit der Taschenklappen überprüft. Analog zu den Rattenaortenkonduits, erfolgte die Lagerung der porcinen Konduits bis zum Beginn der Dezellularisierung in sterilen PBS.

2.2.2 Dezellularisierungsprotokolle

Technische Durchführung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Eignung verschiedener Dezellularisierungsprotokolle auf Grundlage unterschiedlicher Chemikalien zu evaluieren. Hierbei ist es von großer Bedeutung das Dezellularisierungsverfahren einheitlich durch-

zuführen um mögliche Störfaktoren, welche etwa durch physikalische Einflüsse bedingt sein können, gering zu halten.

Sofern nicht anders beschrieben, fanden sämtliche Verfahrensschritte bei Raumtemperatur auf einem Schüttler statt. Als Schüttelgeschwindigkeit wurden 220 U/min festgesetzt.

Die porcinen Proben wurden wie in 2.2.1 beschrieben präpariert und in autoklavierten, aufrechtstehenden 250 ml Vierkant-Glasreaktionsgefäßen dezellularisiert. Standardmäßig wurden 125 ml Reaktionslösung zu den Proben hinzugeben.

Die Aortenkonduits der Ratte wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen dezellularisiert. Diese wurden mit 45 ml Reaktionslösung gefüllt und im Anschluss in waagerechter Position in eine Schachtel aus Pappe auf den Schüttler positioniert.

Die Lösungswechsel für die Proben der Molekularbiologischen- und Zellkulturstudien wurden unter laminarer Strömung in der Sterilbank durchgeführt. Hierbei wurde jeweils die verwendete Lösung unter Einsatz von Stabpipetten abgesaugt und durch die nächste Lösung ausgetauscht. Während sämtlicher Lösungswechsel wurde ein Kontakt mit den Werkzeugen für den Lösungswechsel und den Proben sorgfältig vermieden, um druckbedingte Artefakte zu vermeiden.

Als Kontrollgruppen dienten native Proben, welche ebenfalls wie in 2.2.1 beschrieben präpariert wurden, das Dezellularisierungsverfahren jedoch nicht durchliefen.

Protokollvarianten

Diese Arbeit vergleicht Dezellularisierungsprotokolle, die sich durch die eingesetzten Substanzen, Abläufe und Dauer unterscheiden. Wie einleitend beschrieben, wurde das von der Arbeitsgruppe um Allison R. Gillies et al. Beschriebene Verfahren, welches auf die Verwendung von Detergenzien und proteolytische Substanzen gänzlich verzichtet, mit einem detergenzien- basierten Verfahren verglichen.

Das von Gillies et al. beschriebene Verfahren zur Dezellularisierung von Skelettmuskulatur wurde in dieser Arbeit auf Ratten- und Schweineaortenkonduits übertragen und angewandt (Protokoll 2).

Nach Durchlaufen des Protokolls von Gillies et al. zeigte die histologische Auswertung (HE- und DAPI- Färbung) der Präparate der Spezies Ratte jedoch eine unzureichende Azellularität. Aus diesem Grund wurde das ursprüngliche Verfahren in mehreren Versuchsreihen optimiert (Protokolle 3 bis 11). Das Protokoll 3 zeigte in der histologischen Untersuchung das beste Ergebnis in Bezug auf Zellfreiheit und strukturellen Erhalt der EZM, so dass dieses als Versuchsprotokoll für die Spezies Ratte festgelegt wurde.

In den Vergleichsgruppen kam ein bereits mehrfach publiziertes und in unserer Arbeitsgruppe gut etablierten detergenzien- basiertes Verfahren (Protokoll 1) zum Einsatz [52, 83, 84].

Protokoll 1

Bei einer Gesamtdauer von 168 h, basierte dieses Protokoll auf Natriumlaurylsulfat (SDS), Desoxycholsäure (DCA) und Natriumazid (NaN₃). Die Tage 4-7 entsprachen Spülschritten zum Auswaschen der eingesetzten Substanzen. Das Penicillin/Streptomycin wurde verwendet um einer Kontamination entgegen zu wirken. Der genaue Ablauf des Protokolls ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Zeit	Lösungen
Tag 1-2 (48 h)	0,5% SDS + 0,5% DCA + 0,05% NaN ₃ in Aqua Bidest. Lösungswechsel alle 12 h.
Tag 3 (24 h)	0,05% NaN ₃ in Aqua Bidest.
Tag 4-7	1% Penicillin/Streptomycin in PBS Lösungswechsel alle 24 h

Tabelle 1: Ablauf Protokoll 1.

Protokoll 2

Die Gesamtdauer dieses Protokolls betrug 144 h. Die Inkubation mit Latrunculin B erfolgte bei 37°C im Wärmeschrank. Bei Anwendung an die Aortenkonduits der Ratte wurden die DNase-Schritte in 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml DNase-

Lösung (DNase in Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)) durchgeführt. Eine detaillierte Auflistung der einzelnen Arbeitsschritte ist Tabelle 2 zu entnehmen. Für den porcinen Teil der Studie wurde dieses Protokoll verwendet.

Zeit	Lösungen
Tag 1: 2 h	50 nM Latrunculin B in <i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i> bei 37°C
2 x 15min	Aqua Bidest.
2 h	0,6 M Kaliumchlorid in Auqua Bidest.
2 x 15min	Aqua Bidest.
2 h	1 M Kaliumiodid in Aqua Bidest
Über Nacht	Aqua Bidest.
Tag 2: 2 h	0,6 M Kaliumchlorid in Auqua Bidest.
2 x 15min	Aqua Bidest.
2 h	1 M Kaliumiodid in Aqua Bidest
2 x 15min	Aqua Bidest.
2 h	1 kU/ml DNase in PBS
2 x 15min	Aqua Bidest.
Tag 3-5	Aqua Bidest. Lösungswechsel alle 24 h

Tabelle 2: Ablauf Protokoll 2.

Protokoll 3

Dieses Protokoll hatte eine Gesamtdauer von 168 h und war das Ergebnis ausführlicher Testreihen zur Optimierung des Dezellularisierungserfolges der Rattenaortenkonduits. Das Protokoll 3 basierte auf einer Weiterentwicklung von Protokoll 2. Es wurde um einen Tag verlängert und am dritten Tag sämtliche Schritte der ersten beiden Tagen in verkürzter Form wiederholt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind ausführlich in Tabelle 3 aufgeführt.

Zeit	Lösungen
Tag 1-2	Ablauf Protokoll 2 entsprechend
Tag 3: 1 h	50 nM Latrunculin B in <i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i> bei 37°C

2 x 15min	Aqua Bidest.
1 h	0,6 M Kaliumchlorid in Auqua Bidest.
2 x 15min	Aqua Bidest.
1 h	1 M Kaliumiodid in Aqua Bidest
2 x 15min	Aqua Bidest.
1 h	0,6 M Kaliumchlorid in Auqua Bidest.
2 x 15min	Aqua Bidest.
1 h	1 M Kaliumiodid in Aqua Bidest
2 x 15min	Aqua Bidest.
1 h	1 kU/ml DNase in PBS
2 x 15min	Aqua Bidest.
Tag 4-6	Aqua Bidest. Lösungswechsel alle 24 h

Tabelle 3: Ablauf Protokoll 3

Protokoll 4

Dieses Protokoll entsprach einer Modifizierung von Protokoll 2. Zu Beginn wurde alternierend fünfstündig mit 50 nM Latrunculin B in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* behandelt. Darüber hinaus wurde die Dauer der Schritte in 0,6 M Kaliumchlorid-Lösung und 1 M Kaliumiodid-Lösung von 2 h auf 3 h erhöht.

Protokoll 5

Dieses Protokoll entsprach ebenfalls einer Modifikation von Protokoll 2. Hier wurde alternierend der DNase-Schritt am 2. Tag von 2 h auf 5 h verlängert. Der übrige Ablauf entsprach Protokoll 2.

Protokoll 6

Das Protokoll 6 war eine Erweiterung von Protokoll 5. Zusätzlich zu den Modifikationen von Protokoll 5, wurde als vorgeschalteter Schritt an Tag 1 zweistündig mit 0,5% SDS und 0,5% DCA in Aqua Bidest. sowie einem anschließenden Spülschritt für 2 x 15 min in Aqua Bidest. behandelt. Der übrige Ablauf entsprach Protokoll 5.

Protokoll 7

Analog zu Protokoll 6 wurde in Protokoll 7 ebenfalls ein zweistündiger Schritt in 0,5% SDS und 0,5% DCA in Aqua Bidest. sowie ein anschließender Spülschritt für 2 x 15 min in Aqua Bidest. durchgeführt. In Abweichung zu Protokoll 6, wurde dieser Schritt jedoch erst nach erfolgter Inkubation mit Latrunculin B für 2 h und anschließenden Spülschritt für 2 x 15 min in Aqua Bidest. durchgeführt.

Protokoll 8

Das Protokoll 8 beinhaltete ebenfalls den Einsatz von Detergenzien. Dieser war analog zu Protokoll 6 und 7, wurde jedoch als erster Schritt des 2. Tages durchgeführt.

Protokoll 9

Im Rahmen der Ermittlung des optimalen Zeitpunktes für den Einsatz von Detergenzien wurde in Protokoll 9 der Zeitpunkt für diesen erneut variiert. Im Unterschied zu Protokoll 8 wurde der Detergenzien-Schritt bei ansonsten gleichen Ablauf am Ende des 2. Tages durchgeführt.

Protokoll 10

Eine zusätzliche Behandlung der Proben mit 0,5% Triton X in Aqua Bidest. für 2 h und anschließende Spülschritte (2 x 15 min in Aqua Bidest.) zu Beginn von Tag 1 wurden in Protokoll 10 abweichend von Protokoll 2 durchgeführt. Der übrige Ablauf entsprach Protokoll 2.

Protokoll 11

Das Protokoll 11 war eine weitere modifizierte Variante von Protokoll 2. Die Dauer der Inkubation mit der Latruncilin B-Lösung und der 0,6 M Kaliumchlorid-Lösung wurde am ersten Tag von 2 h auf 3 h erhöht. Die 1 M Kaliumiodid-Lösung wurde anstelle von 2 h über die gesamte Nacht von Tag 1 auf 2 verwendet und anschließend wurde 2 x 15 min in Aqua Bidest. gespült. Am 2. Tag wurde der Schritt der 0,6 M Kaliumchlorid-Lösung ebenfalls von 2 auf 3 h erhöht. Die weiteren Schritte entsprachen Protokoll 2.

2.2.3 Histologie

Konzeption und Aufbereitung

Zur vergleichenden Beurteilung der strukturellen Charakteristika der dezellulierten Konduits erfolgte im Anschluss an die Dezellularisierung die histologische Aufarbeitung der Proben.

Die Aortenkonduits der Spezies Ratte wurden zur besseren Vergleichbarkeit in drei Regionen unterteilt (siehe Abb. 1): Den Bereich der Aortenklappen (Region A), den Bereich der Aorta ascendens (Region B) sowie den Bereich der Aorta descendens (Region C).

Es wurden jeweils Präparate zur Paraffineinbettung und zur Einbettung in Gefriermedium (Kryotechnik) generiert. Je Region wurden mindestens 30 Schnitte in Kryotechnik á 4µm, in Paraffintechnik á 5 µm erstellt und anschließend gefärbt.

Die Einbettung in Paraffin birgt gegenüber der Kryotechnik den Vorteil einer besseren Beurteilbarkeit der EZM, da es bei dieser Technik während des Schneidens seltener zu Rissen in den Präparaten kommt und somit Fehlinterpretationen durch Artefakte vermieden werden können.

Die histologische Aufarbeitung der Proben porcinen Ursprungs verlief leicht abweichend. Für die Analyse in Kryotechnik wurde auf Grund technischer Limitationen nach Abschluss der Dezellularisierung mittig auf Höhe des Nodus valvulae semilunaris aus der Aortentasche Gewebe entnommen (siehe Abb. 3).

Für die Analyse mittels Paraffineinbettung wurde die Aortenwurzel mit der enthaltenen Klappenregion über 24 h in einer 4% Formalinlösung fixiert und anschließend senkrecht zur Aortentaschenebene entlang der Kommissuren inzidiert. Es entstehen drei separate Taschen mit zugehörigem Aortenring und Myokardsaum (siehe Abb. 3). Die einzelnen Taschenklappen wurden alsdann senkrecht zur Schnittebene in Paraffin eingebettet.



Abb. 3: Makroskopische Aufnahme einer porcinen Aortenwurzel nach Dezellularisierung (Protokoll 2). (A) Blick auf die Aortenwurzel mit der Herzklappenebene von oben; (B) Präparat nach Inzision entlang der Kommissur und Eröffnung des Aortenrings; (C) einzelne Aortenklappen zur Paraffineinbettung.

Paraffineinbettung

Die Paraffineinbettung erfordert eine Vorbehandlung des Gewebes, welche nach einem Standardschema durchgeführt wurde.

Zunächst wurden die Proben in 50 ml Zentrifugenröhrchen über 24 h in 4% Formalinlösung fixiert und im Anschluss wie beschrieben zugeschnitten. Es folgten Schritte zur Entwässerung des Gewebes über eine aufsteigende Alkoholreihe. Erst wurde das Gewebe für 60 min in eine 70% Ethanol Lösung überführt, dann für 60 min in eine 80% Ethanol Lösung. Es schloss sich die Überführung in eine 96% Ethanol Lösung für zweimal 60 min an. Zum Abschluss der Alkoholreihe wurde das Gewebe zweimal für jeweils 30 min in 100% Ethanol und zweimal für jeweils 45 min in Xylol gegeben.

Das entwässerte Gewebe wurde nun in drei verschiedene Paraffinbäder für jeweils 1h eingebracht, anschließend ausgerichtet und mit Paraffin in einen Block gegossen. Dieser wurde bei 4°C im Kühlschrank ausgekühlt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Erstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden unter Nutzung eines Mikrotoms (Reichert-Jung 2035 Biocut) erstellt. Die Schnittdicke für Proben zur histologischen Untersuchung betrug 5 µm. Für die Proben zur Bestimmung des relativen Kollagen/Proteinverhältnisses wurde eine Schnittdicke von 15 µm gewählt.

Vor dem Schneiden wurden die Blöcke zunächst auf Kühlplatten gekühlt. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte in ein warmes Wasserbad (*Tissue Flotation Bath*, Firma Mediate) übertragen, um das Auftreten von Falten zu vermeiden. Aus

dem Wasserbad wurden die Schnitte auf Objektträger aufgefangen und anschließend über mehrere Stunden auf einer Streckbank bei 56°C getrocknet.

Entparaffinierung

Zum Anfärben von Paraffinschnitten ist eine vorherige Entparaffinierung notwendig. Hierfür wurden die Objektträgern mit den Paraffinschnitten zunächst zweimal je 1 min in 100% Xylol gegeben, durchliefen anschließend eine absteigenden Alkoholreihe (100% Ethanol für 1 min, 96% Ethanol Lösung für 1 min, 70% Ethanol Lösung für 1 min) und wurden abschließend für 1 min in destilliertem Wasser hydratisiert.

Erstellung von histologischen Kyroschnitten

Die konzeptionelle Unterteilung und anatomische Ausrichtung der Präparate erfolgte wie bereits beschrieben. Unmittelbar nach Abschluss der Dezellularisierung wurden die Präparate in ein Gefriermedium (Tissue-Tek©) eingelegt und bei -80°C kältefixiert bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die histologischen Schnitte wurden mit einem Kryostat erstellt und anschließend bei -20°C gelagert.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung ermöglicht einen orientierenden Überblick über den Dezellularisierungserfolg mit Blick auf den Strukturhalt der EZM und die Azellularität. Die Zellkerne stellen sich durch den Farbstoff Hämatoxylin dunkelblau dar, die EZM wird durch den Farbstoff Eosin magentafarben gefärbt.

Im ersten Schritt der Färbung wurden die Objektträger mit den angefertigten histologischen Schnitten für 1 min in Hämatoxylin gegeben. Es folgte jeweils für 1 min die Überführung in destilliertes Wasser, Eisessigwasser (5%), erneut destilliertes Wasser, Leitungswasser und 70% Ethanol. Es schloss sich die Färbung in Eosin B für 15 min an. In den finalen Schritten des Färbevorganges durchliefen die Präparate eine aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol Lösung für 1 min, 96% Ethanol Lösung zweimal für je 1 min, 100% Ethanol zweimal für je 1 min) und wurden darauf für 1 min in Xylol entfettet.

Nach Abschluss der Färbung wurden die Schnitte, nach kurzem Trocknen, mit Eindeckmedium eingedeckt.

Die Paraffinschnitte wurden vor dem Färbevorgang wie beschrieben entparaffiniert.

Movat-Pentachrom-Färbung

Eine detailliertere morphologische Untersuchung der mikroskopischen Beschaffenheit des Gewebes ist mit der Movat-Pentachrom-Färbung möglich. Diese Färbung stellt unterschiedliche Bestandteile der EZM in verschiedenen Farben dar und ermöglichte so die Analyse der Effektivität der Dezellularisierung abhängig vom molekularen Aufbau der Strukturen. So stellen sich Kollagene gelblich dar, elastische Fasern braun, Glykosaminoglykane grün, Zytoplasma rot und Zellkerne dunkelblau bis schwarz [87].

Als vorbereitender Schritt für die Färbung wurden die Schnitte zunächst wie beschrieben entparaffiniert. Auf die Entparaffinierung folgte ein 10 minütiges Färben in einer Alcianblaulösung (1 g Alcianblau und 1 ml Eisessig in 100 ml zweifach destilliertem Wasser) mit anschließenden 5 minütigen Spülen in Leitungswasser. Daraufhin wurden die Schnitte für 60 min in alkalischem Alkohol stabilisiert und erneut gespült (10 min unter fließendem Leitungswasser, 2 min in Aqua bidest.). Die Präparate wurden für 10 min in Weigerts Eisenhämatoxylin (1g Hämatoxylin, 1,16 g Eisen-III-Chlorid und 1 ml 25% Salzsäure in 200 ml Aqua bidest.) überführt und nach Abschluss des Färbeschrittes erneut mit destilliertem Wasser gespült. Es schloss sich ein weiterer Färbeschritt in filtriertem Brillant Crocein-Säurefuchsin für 15 min an (Gemisch aus 0,1g Brillant Crocein R, 0,5 ml Eisessig in 100 ml Aqua bidest. und 0,1 g Säurefuchsin, 0,5 ml Eisessig in 100 ml Aqua bidest. im Verhältnis 4:1). Nach kurzem Spülen in 0,5% Eisessigsäure, wurden die Proben für 20 min in 5% Phosphorwolframsäure überführt und anschließend erneut für 2 min in 0,5% Eisessigsäure gespült. Für den nächsten Färbeschritt war eine vollständige Dehydrierung der Schnitte notwendig. Daher wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 min in 100% Ethanol überführt bevor sie für 60 min in einer Safran du Gatinais-Lösung (6 g Safran in 100 ml 100% Ethanol, vor Gebrauch 48h lang bei 50°C extrahiert) gefärbt wurden. Abschließend durchliefen die Präparate eine erneute Alkoholreihe (dreimal 100% Ethanol für je 1min) und wurden zweimal für 1 min in Xylol entfettet.

Nach kurzem Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit Eindeckmedium eingedeckt.

4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) lagert sich an DNA-Stränge an und fluoresziert nach Anregung mit ultraviolettem Licht blau. Auf Grund dieser Eigenschaft eignete sich die DAPI Färbung ideal zur Detektion von DNA-Residuen. Verbleibende DNA-Reste werden sichtbar gemacht und morphologisch einem Bereich im Gewebe zugewiesen.

Zur Anwendung kam das *Vectashield Mounting Medium mit DAPI*. In einem abgedunkelten Raum wird von diesem jeweils je ein Tropfen auf die Schnitte gegeben und anschließend einige Minuten bis zur Auswertung mit einem Fluoreszenzmikroskop gewartet. Paraffinschnitte wurden vor dem Auftragen des Färbemediums wie beschrieben entparaffiniert.

Indirekte Immunfluoreszenz Kollagen IV

Kollagen IV ist ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran [88, 89]. Über die indirekte Immunfluoreszenz kann Kollagen IV gezielt nachgewiesen werden und im Präparat lokalisiert werden. Hierbei bindet zunächst ein primärer Antikörper an die Zielstruktur und wird in einem zweiten Schritt mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper markiert.

Jeder Färbedurchlauf schloss sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle ein. Als Positivkontrolle wurden native, unbehandelte Präparate der Proben gewählt. Als Negativkontrolle wurde bei den jeweiligen Proben jeweils auf den Primärantikörper verzichtet und lediglich der Sekundärantikörper hinzugefügt.

Zu Beginn der Färbung erfolgte die Fixierung der Proben in Aceton für 10 min und anschließendes Trocknen der Proben für 5 min bei Raumtemperatur. Es schloss sich ein Waschschriff mit dreimaligem Waschen der Proben in PBS für jeweils 5 min an. Danach wurden die Schnitte mit 0,1% Triton X- 100 in PBS für 5 min versetzt und anschließend erneut dreimalig für jeweils 5 min in PBS gewaschen.

Es folgte die Inkubation der Proben mit dem Erstantikörper (Abcam Anti-Kollagen IV Antikörper, ab 6586). Hierfür wurde eine Konzentration des Antiköpers von 1:100 in PBS gewählt und anschließend die Proben in einer Feuchtekammer für 1 h mit diesem versetzt. Auf vorheriges Blockieren der Proben wurde verzichtet. Nach Abschluss dieses Schrittes wurde erneut dreimalig für 5 min in PBS gewaschen und die Anwendung des Zweitantiköpers vorbereitet.

Als Zweitantikörper wurde der Invitrogen Alexa Fluor® 546 Antikörper in einer Konzentration von 1:200 in PBS verwendet. In lichtsparender Arbeitsweise, wurden die Proben für 30 min in einer Feuchtekammer mit dem Antikörper versetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde dreimalig für 5 min in PBS und für 1 min in destilliertem Wasser gespült. Abschließend wurden die Proben für 5 min in 100% Ethanol gegeben und mit Vectashield Mounting Medium mit DAPI eingedeckt.

Im Anschluss erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop oder die lichtgeschützte Lagerung der Proben bei -20 °C.

2.2.4 Relativer Kollagenanteil

Die Bestimmung des relativen Kollagenanteiles erfolgte über ein von Junqueira, L.C.U. et al. beschriebenes indirektes, photometrisches Verfahren [90]. Hierfür wurden zunächst 15 µm Paraffinschnitte der Proben erstellt und diese anschließend unter Verwendung der Farbstoffe Picro Sirius Red (PSR) und Fast Green (FG) gefärbt.

Die Farbstoffe dieser Färbungen lagern sich an unterschiedliche Komponenten des Gewebes an. Der Farbstoff PSR bindet vornehmlich an Kollagene, der Farbstoff Fast Green färbt sämtliche Proteine mit Ausnahme von Kollagenen an [90].

Zunächst wurden die Proben entparaffiniert und anschließend für 60 min lichtgeschützt in eine Färbelösung überführt. Die Färbelösung setzte sich aus 0,1% PSR und 0,1% Fast Green in gesättigter Pikrinsäure zusammen. Nach Abschluss des Färbeschrittes erfolgte ein zweimaliges Bad in 0,01 M Salzsäure für jeweils 2 min, an das sich zweimaliges Entwässern für 5 min in 100% Ethanol anschloss. Abschließend wurden die Proben dreimalig in *Histoclear*® für jeweils 5 min gespült.

Die gefärbten Schnitte wurden nun unter Zuhilfenahme eines Skalpell jeweils in Reagenzgefäße, welche mit 1 ml 0,1 M Natriumhydroxid und 1 ml 100% Methanol gefüllt waren, überführt und bis zur vollständigen Entfärbung der Schnitte geschüttelt. Die Schnitte wurden im Folgenden aus den Reagenzgefäßen entfernt und innerhalb von 2 h bei lichtgeschützter Lagerung die Extinktion der Lösung bei 540 nm (PSR) und 605 nm (FG) an einem Photometer (Spektralphotometer,

Beckmann DU 640) gemessen.

Anhand der gemessenen Extinktionswerte war es auf Grund der unterschiedlichen Zielstrukturen und Extinktionsbereiche der Farbstoffe möglich, den relativen Kollagenanteil zu bestimmen. Die gemessene Extinktion von PSR bei 540 nm ist um die Extinktion von FG in diesem Wellenlängenbereich zu korrigieren. Hierfür wurde das Produkt aus dem Korrekturfaktor 0,291 und der Extinktion bei 605 nm von dem Extinktionswert bei 540 nm subtrahiert. Zur Bestimmung des Gesamtkollagengehaltes bzw. des Gesamtproteingehaltes wurden die Extinktionswerte durch die entsprechenden Farbäquivalente dividiert (PSR: 2,08; FG: 38,4). Für PSR wurde der korrigierte Extinktionswert verwendet. Abschließend wurde der Quotient aus dem Gesamtkollagengehalt und dem Gesamtproteingehalt gebildet, um den relativen Kollagenanteil im Verhältnis zum Gesamtprotein zu erhalten. [91]

2.2.5 DNA- Quantifizierung

Der DNA-Gehalt der Proben wird vielfach als Parameter zur Evaluation des Dezellularisierungserfolgs herangezogen [92-95].

Für die DNA-Isolation wurde das QIAamp DNA Mini Kit von der Firma Qiagen nach geringfügig modifizierten Herstellerangaben verwendet [96]. Die Proben stammten bei beiden Spezies von jeweils unterschiedlichen Tieren. Bei der Spezies Ratte wurde auf Grund der geringen Probenmenge auf eine Unterteilung in Regionen wie in 2.2.1 beschrieben verzichtet. Die Analyse des Gewebes porcinen Ursprungs erfolgte an den *in toto* exzidierten Segeln der Taschenklappen. Es wurden weder Anteile der Aortenwand noch des Myokardes einbezogen. Als Vergleichsgruppe wurden bei beiden Spezies analoge, unbehandelte Nativgewebe verwendet.

Nach Durchlaufen der entsprechenden Dezellularisierungsprotokolle wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Nativgewebe wurden nach der Explantation gründlich mit 0,9% NaCl-Lösung von Blutrestbeständen befreit und ebenfalls bis zu weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zu Beginn der DNA-Isolation wurden die Proben zunächst gewogen und anschließend tiefgefroren gemörsert. Zur weiteren Aufspaltung des Gewebes

wurden die Proben dann mit 250 µl ATL-Puffer und 40 µl Proteinase K versetzt und bei 56°C im Thermoblock mit 700 U/min über Nacht inkubiert.

Die Proben wurden danach für 1 min mit 8000 rpm zentrifugiert, mit 4 µl RNase A versetzt und nach kurzem Schütteln auf dem Vortex-Schüttler, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem 2 minütigen Zentrifugieren mit 8000 rpm wurden 200 µl AL-Puffer hinzugegeben. Es wurde abermals kurz geschüttelt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Die Proben wurden dann mit 200 µl 100% Ethanol versetzt und für 1 min mit 8000 rpm zentrifugiert.

Es schloss sich die Übertragung der Proben auf die im *Kit* enthaltenen Säulen an. Streng gemäß den Herstellervorgaben, wurden nun 500 µl AW1- Puffer auf die Säulen pipettiert, für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert und anschließend 500 µl AW2- Puffer hinzugegeben und für insgesamt 4 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen und die Auffangreaktionsgefäße ausgetauscht.

Als letzter Schritt wurden nun die Säulen auf neue Reaktionsgefäße umgesetzt, mit 50 µl zweifach destillierten Wasser versetzt und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur für 1 min mit 8000 rpm zentrifugiert. Der aufgefangene Durchfluss enthielt die DNA und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Messung der enthaltenen DNA-Konzentration erfolgt an einem *Nanodrop* unter Verwendung der für DNA-Konzentrationsmessungen optimierten Voreinstellungen des Herstellers. Gemessen wurde die Lichtabsorption bei 260 nm.

Um die Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten, wurden diese mit dem Ausgangsfeuchtgewicht ins Verhältnis gesetzt und der DNA Gehalt in µg pro g Gewebe ermittelt.

2.2.6 Glykosaminoglykangehalt

Die Ermittlung des Glykosaminoglykangehaltes der Proben erfolgte mit dem *Blyscan Glycosaminoglycan Assay* der Firma *BioColor*. Die Anwendung erfolgt nach den Empfehlungen des Herstellers.

Die Auswahl der Gewebe erfolgte analog dem Vorgehen zur Ermittlung des DNA-Gehalts.

Zur Lyse der eingesetzten Gewebe wurde ein Papain-Reagenz hergestellt. Zu 100 ml eines 0.2 molaren Natriumphosphat Puffers (pH 6,4) wurden 800 mg Natriumacetat, 400 mg Na₂EDTA, 80 mg Cystein HCL sowie 500 µl Papain-Lösung hinzugegeben. Die Proben wurden gewogen, zerkleinert (*via* Skalpell steril in kleine Stücke) und in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß mit 1 ml der Papain-Reagenz versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation in einem *Eppendorf-Thermomixer* bei 65°C und 500 U/min über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Proben auf einem *Vortex-Schüttler* geschüttelt und 100 µl der Lösung in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Rest wurde verworfen.

Zur Ermittlung einer Standardkurve wurden parallel in 5 Mikroreaktionsgefäßen (1,5 ml) jeweils 10, 20, 30, 40 und 50 µl einer Standardlösung (Chondroitin-4-sulfat-Lösung) gegeben und mit dem Papain-Reagenz auf 100 µl aufgefüllt. Dies entsprach jeweils einer Menge von 1, 2, 3, 4 und 5 µg an Glykosaminoglykan (GAG) in den entsprechenden Reaktionsgefäßen.

Sowohl die Standardproben als auch die Versuchsproben, wurden in der Folge für 30 min unter leichtem Schütteln (400 U/min) mit 1 ml des *Blyscan Dye Reagent* versetzt. Anschließend wurden die Proben für 10 min mit 12 000 rpm zentrifugiert. Sofern GAG in den Proben vorhanden waren, wurden blaue Abscheidungen am Boden der Reaktionsgefäße sichtbar.

Der Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette dekantiert und verworfen. Der Bodensatz wurde mit 0,5 ml der *Blyscan Dissociation* Reagenzlösung versetzt und unter leichtem Schütteln für 10 min oder bis zum vollständigen Auflösen der Kristalle bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Proben wurden nun erneut auf dem *Vortex-Schüttler* geschüttelt und anschließend die Extinktion bei 656 nm im Photometer gemessen.

Aus den Ergebnissen der Standardlösungen wurde eine Standardkurve berechnet und der GAG-Gehalt der Versuchsproben extrapoliert. Auch hier wurden zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit die ermittelten Ergebnisse mit dem Feuchtgewicht des Gewebes in Verhältnis gesetzt und der Gehalt an GAG in µg pro Gramm Gewebe errechnet.

2.2.7 Proteinanalyse

Konzeption und vorbereitende Schritte

Als Ausgangsmaterial für die Proteinanalyse dienten die nach den jeweiligen Protokollen dezellularisierten Proben sowie die nativen Kontrollgruppen. Nicht unmittelbar nach Abschluss der Protokolle verwendete Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Proben der Spezies Ratte wurden auf einem Trenngel mit 10 Taschen und jeweils 3 Proben der entsprechenden Protokolle (3x Nativ, 3x Protokoll 1, 3x Protokoll 3) parallel analysiert.

Die Proben porcinen Ursprungs wurden auf einem Trenngel mit 15 Taschen mit jeweils 3 Proben der Gruppe Nativ und jeweils 5 Proben der Gruppen Protokoll 1 und 2 (3x Nativ, 5x Protokoll 1, 5x Protokoll 2) untersucht.

Die Trenngele wurden wie folgt hergestellt: In 15 ml Reagenzgefäße wurden 40% Acrylamid/Bisacrylamid (3,5 ml), Aqua dest. (3,8 ml), Tris Base 1,5 M pH 8,8 (2,5 ml), 20% SDS 50 µl, Ammoniumperoxosulfat (APS) 10% (100 µl), TEMED (5 µl) gegeben und anschließend in die Gelkammern übertragen.

Die Sammelgele wurden wie folgt hergestellt: Acrylamid/Bisacrylamid (720 µl), Aqua dest. (3,5 ml), Tris Base 1 M pH 6,8 (650 µl), 20% SDS 25 µl, Ammoniumperoxosulfat (APS) 10% (50 µl), TEMED (5 µl).

Probenaufbereitung und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteinbestimmung musste das Protein aus dem Gewebe extrahiert werden. Die Proben wurden hierfür gewogen, in gefrorenen Zustand gemörsert und in einen *Radioimmunoprecipitation assay* (RIPA; 25 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% DCA, 1% Triton X 100) Extraktionspuffer (70 µg pro 100 mg Probe) überführt. Zur weiteren Aufspaltung des Gewebes wurden die Proben anschließend für 15 Sekunden bei 10 000 Hz mit einer Ultraschallsonde sonifiziert und 10 min lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation der Proben über 10 min bei 12 000 rpm.

Nach der Proteinextraktion wurde die Quantifizierung des Proteingehaltes unter Verwendung eines Bichinonsäure (*BCA*)-Assays durchgeführt. Hierfür wurde eine Kupfersulfat Lösung (*CCS*) im Verhältnis 1:50 mit *BCA* gemischt und anschließend jeweils 800 µl dieser Stammlösung mit 20 µl der Proben versetzt.

Das Gemisch wurde nun 15 min bei 60 °C inkubiert. Die Messung des Proteingehaltes erfolgte photometrisch mit dem *Eppendorf Biophotometer plus* durch die Ermittlung der Extinktion bei 550 nm. Die absolute Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardkurve bestimmt.

Die eingesetzte Proteinmenge für die Gelelektrophorese wurde, adaptiert an die Taschengröße der Gele, über alle Gruppen standardisiert. Die entsprechenden Mengen an Proteinlysate wurden in *Eppendorf-Reaktionsgefäße* überführt und mit *Laemmli-Puffer* [97] versetzt. Hierbei wurde ein Verhältnis von Probe zu Puffer von 3:1 verwendet.

Nach Zugabe des *Laemmli-Puffers*, wurden die Proben zur Proteindenaturierung für 5 min bei 95 °C gekocht, anschließend zentrifugiert und bis zur Überführung auf das Gel bei 4 °C gelagert. Als Komigrationsstandard wurden 4 µl *PageRuler* und 1 µl *SuperSignal Molecular Weight Protein Ladder* in eine separate Tasche hinzugegeben.

Nach der Überführung der Proben auf die Gele folgte die Gelelektrophorese mit dem *XCell SureLock*® System der Firma *Invitrogen* in Kombination mit dem *Electrophoresis Power Supply EPS 301* System der Firma *Amersha Pharmacia Biotech*. Zunächst wurden die Peptide über 10-15 min bei 20 mA pro Gel (maximal zwei Gele je Durchgang) in das Sammelgel eingelaufen. Bei Erreichen des Trenngels, wurde im Anschluss die Stromstärke auf 70 mA pro Gel erhöht und die Elektrophorese für 1 h gefahren. Zur Vermeidung einer Überhitzung erfolgte eine kontinuierliche Eiskühlung des *XCell SureLock*® Systems.

Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte der Proteintransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (*PVDF*)-Membran mittels eines *Western Blots* [98]. Hier wurde das *Trans-Blot*® *SD Semi-Dry Transfer Cell* der Firma *Bio-Rad* verwendet.

Das Gel wurde in einen Kathodenpuffer überführt (25mM Tris-Base, 40mM Glycin, 10% Methanol, pH 9.4) und dort bis zum Beginn des *Blots* gelagert.

Der Aufbau des *Blots* und die Durchführung erfolgten gemäß Herstellerangaben, auf eine genaue Auflistung der umfangreichen Arbeitsschritte wird daher verzichtet.

Es wurde für 90 min mit 80 mA pro *Blot* geblottet. Nach Abschluss des *Western Blots* wurde die PVDF-Membran in einen *Tris-Buffered Saline and Tween 20* (TBST)-Puffer (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl mit 0,1% Tween 20) überführt und anschließend für 1 h mit 5% Milch in TBST blockiert.

Es schloss sich ein Waschschrift mit dreimaligem Waschen für 15 min in TBST an bevor im nächsten Schritt die Membran mit den Erstantikörpern versetzt wurde. Zum Einsatz kamen ein β -Aktin Antikörper (Konzentration: 1:1000 in 5% Bovinen Serum Albumin (BSA)) und ein β_2 -Mikroglobulin Antikörper (Konzentration: 1:1000 in 5% Milch in TBST). Die PVDF-Membranen wurden auf Höhe der benötigten Molekulargewichtchargen aufgetrennt. Die Chargen wurden danach in einem 50 ml Reagenzgefäß mit jeweils 5 ml der entsprechenden Antikörper versetzt und bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert.

Nach erneutem dreimaligen 15 min Waschen in TBST wurde der Zweitantikörper hinzugeben. Als Zweitantikörper wurde der *Promega Anti-Rabbit*-Antikörper der Firma Promega (Madison, WI, USA) verwendet. Abhängig vom eingesetzten Primärantikörper wurden unterschiedliche Konzentrationen der Sekundärantikörper gewählt. War der Erstantikörper β -Aktin, so wurde für den Zweitantikörper eine Konzentration von 1:20 000 in 5% Milch in TBST gewählt; fungierte β_2 -Mikroglobulin als Erstantikörper, so wurde eine Konzentration von 1:10 000 in 5% Milch in TBST verwendet. Inkubiert wurde jeweils mit 15 ml für 2 h bei Raumtemperatur unter ständigem langsamen Schütteln.

Abschließend wurde erneut wie zuvor in TBST gewaschen. Es folgte die Entwicklung. Als Entwicklungslösung wurden je Blot 500 μ l *SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate* der Firma Thermo Scientific auf die PVDF-Membranen gegeben und die Membranen in Autoklavierbeutel eingeschweißt.

Die *Blots* wurden im EpiChemie II der Firma UPV© BioImaging Systems gemäß den Herstellerangaben entwickelt und digital visualisiert. Stellte sich das detektierte Signal in der Folge als ungenügend heraus, wurde bei gleicher

Anwendungstechnik *SuperSignal West™ Femto Chemiluminescent Substrate* ebenfalls der Firma Thermo Scientific als Entwicklungslösung verwendet.

Die Auswertung wurde mit der Software ImageJ v1.46 durchgeführt.

2.2.8 Zytotoxizitätstests

Wichtige Aspekte bei der Entwicklung von Dezellularisierungsverfahren sind der Einfluss der eingesetzten Substanzen auf die Rebesiedelung und der Ausschluss toxischer Effekte auf potentielle Empfänger der *tissue engineeren* Organe [92].

Mit Hilfe der indirekten *invitro* Zytotoxizitätsmessung können die Effekte auf die Zellproliferation und Vitalität von Zellen ermittelt werden. Für diese Analyse wurden Humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Frau Prof. Kögler vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Kultur der HUVEC

Die HUVEC wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) und fetalem Kälberserum (FCS) gefroren bereitgestellt. Die Zellen wurden langsam aufgetaut und zügig unter Verwendung einer Stabpipette aus den Kryo-Röhrchen in ein 15 ml Standard-zentrifugenröhrchen, in welchem 8 ml *Endothelial Cell Growth Medium II (ECGM2)* vorgelegt waren, getropft um toxische Effekte des DMSO zu vermeiden.

Das *Endothelial Cell Growth Medium II* war zuvor mit 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und *Endothelial Cell Growth Medium II SupplementMix* des Herstellers versetzt worden und wurde bei allen Zellkulturversuchen als Standardkulturmedium verwendet. Im Folgenden wird das versetzte ECGM2 mit „Kulturmedium“ bezeichnet.

Die Suspension wurde behutsam geschüttelt und im Anschluss zentrifugiert. Folgend wurde der Überstand mit den Resten des DMSOs dekantiert und das Zellpellet erneut in 8 ml Medium resuspendiert. Dieses Procedere wurde einmalig wiederholt und im Anschluss die Zellen in standardmäßig verwendete kollagenbeschichtete T75-Zellkulturflaschen geben. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit und 37 °C.

Die Zellen wurden unter regelmäßigen mikroskopischen Kontrollen kultiviert bis eine Konfluenz von etwa 70% erreicht war. Sobald dieser Grad der Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 aufgeteilt.

Zunächst wurde hierfür das in der Kulturflasche vorhandene Medium abgesaugt und verworfen. Es folgte zweimaliges Waschen mit 10 ml PBS und ein anschließendes Absaugen der Lösung. Daraufhin wurde die Kultur erneut mit PBS versetzt und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das PBS entfernt und der Zellrasen mit 5 ml einer vorgewärmten Trypsin/EDTA-Lösung versetzt, um den Kontakt der Zellen zur Kulturflasche zu lösen. Ein zu langer Kontakt der Zellen mit der Protease Trypsin kann zu einer Zellschädigung führen. Um dies zu vermeiden wurde die Trypsin-Reaktion nach mikroskopischer Bestätigung der Adhäsionolyse des Zellrasens mit 12 ml Kulturmedium gestoppt. Das erhaltene HUVEC/Kulturmedium-Gemische wurde in Standardzentrifugenröhrchen 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 6 ml Kulturmedium resuspendiert. War eine genaue Bestimmung der Zellzahl notwendig, so wurde diese im Anschluss in einer Neubauerzählkammer über ein Anfärben der Zellen mit Tryptanblau bestimmt.

Versuchsabhängig erfolgte der direkte Einsatz oder die erneute Aussaat der Zellen. Sämtliche Zellkulturversuche wurden unter sterilen *Laminar-Air-Flow* Bedingungen durchgeführt.

Konzeption des Zytotoxizitätstests

Für die Zytotoxizitätsbestimmung wurde eine indirekte Methode verwendet. Hierbei kommen die HUVEC nicht in direkten Kontakt mit den Gewebeproben. Es wurden jeweils n=3 Proben der Gruppen Protokoll 1-2 analysiert. Als Ausgangsmaterial wurden Proben porcinen Ursprungs (siehe 2.2.5) ausgewählt. Als Positivkontrolle diente unbehandeltes Standardkulturmedium, als Negativkontrolle wurde eine 70% Methanol Lösung verwendet. Es kamen HUVEC Zellen in der 6.-7. Passage zum Einsatz.

Die Gewebeproben wurden für 24h in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit jeweils 15 ml Kulturmedium gegeben. Nach Abschluss der Inkubation, wurde das auf diese Weise konditionierte Kulturmedium auf bakterielle Kontamination überprüft und mit einem 0,22 µm Spritzenvorstatzfilter steril filtriert.

Zuvor wurden pro Näpfchen 15 000 HUVEC-Zellen in eine kollagenbeschichtete 24-Loch Zellkulturplatte gegeben und dort für 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter mikroskopischer Kontrolle des Zellwachstums, wurde das Zellkulturmedium entfernt und durch das konditionierte Zellkulturmedium ersetzt. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 48 h und anschließend die Bestimmung der Zellvitalität über einen *Life/Dead*®-Assay. Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden standardisiert mittig Bilder der jeweiligen Ansätze erstellt (siehe Abb. 4). Aus diesen Bildern wurden mit Hilfe der Software *ImageJ* v1.47 und dem *Cell Counter Plugin* die Anzahl der vitalen und avitalen Zellen bestimmt.

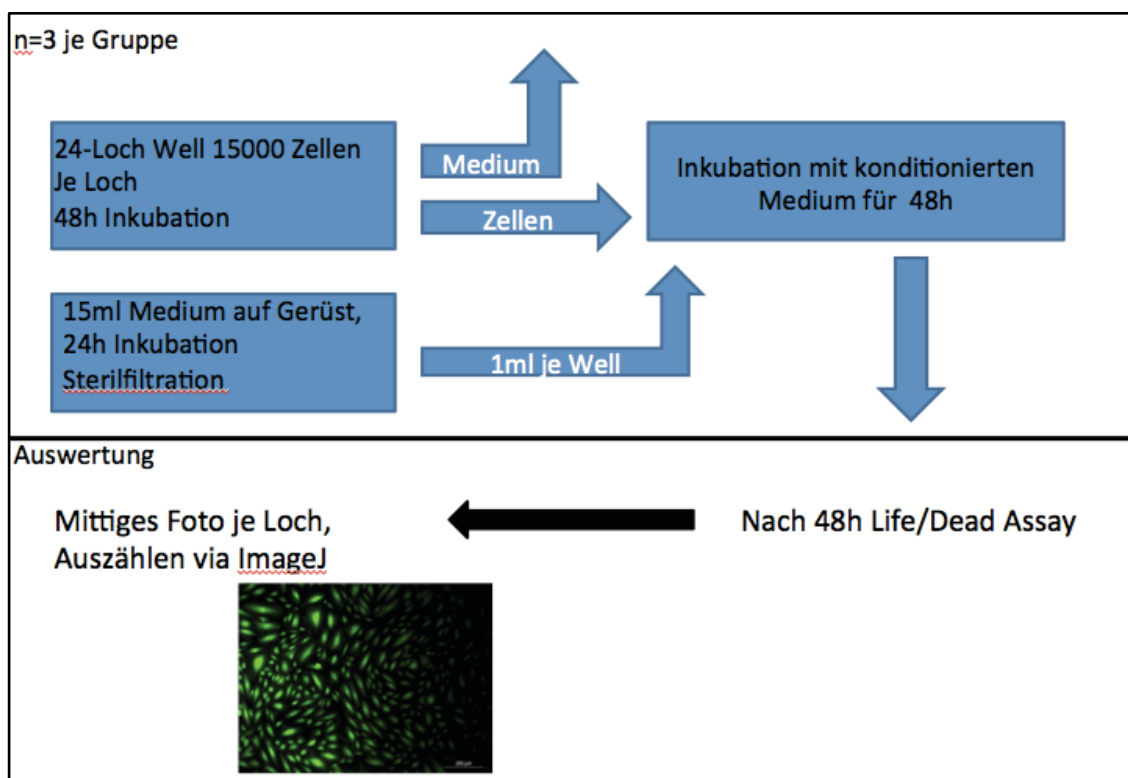


Abb. 4: Schematische Darstellung des Zytotoxizatstests. Zur Anwendung kamen HUVEC Zellen in der 6.-7. Passage.

*Bestimmung der Zellvitalität mittels *Life/Dead*®-Assay*

Die Vitalität der HUVEC wurde über einen *Life/Dead*®-Assay bestimmt. Dieser nutzt die Eigenschaften der Stoffe Calcein-AM und Ethidiumbromid aus um die Integrität von Zellen zu beurteilen.

Das Calcein-AM ist ein nicht fluoreszierender Farbstoff. Erst nach Passage der Zellmembran wird er intrazellulär von unspezifischen Esterasen strukturell

verändert und zum grünen Fluoreszieren angeregt [99]. Vitale Zellen stellen sich somit nach Anregung im Fluoreszenzmikroskop grün dar.

Die Zellmembran stellt eine Barriere für das Ethidium Homodimer dar. Diese kann lediglich überwunden werden sofern die Membran beschädigt ist. Ist dies der Fall, kommt es zur Interkalation des Ethidium Homodimers mit der DNA der Zelle. Die Folge ist eine rote Fluoreszenz. Beschädigte oder avitale Zellen stellen sich folglich in der Fluoreszenzmikroskopie rot dar und konnten als solche identifiziert werden. [100]

Die Färbung wurde in einer 24-Loch Zellkulturplatte nach Abschluss der oben beschriebenen Schritte durchgeführt. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter lichtarmen Bedingungen. Zunächst wurden Calcein-AM und Ethidium Homodimer Stocklösungen erstellt. Zu 1 µl Calcein-AM Lösung (4 mM in DMSO) wurden 9 µl PBS pipettiert; zu 2 µl Ethidium Homodimer Lösung (2 mM in DMSO) wurden 8 µl PBS gegeben und beide Stocklösungen lichtgeschützt gelagert.

Das konditionierte Medium wurde aus den Ansätzen in der 24-Loch Zellkulturplatte abgesaugt und jeder Ansatz mit 1 ml PBS einmalig gewaschen. Zuvor waren für jedes Nöpfchen jeweils 500 µl erwärmtes (37 °C) Zellkulturmedium in sterile Reagenzgefäße vorgelegt worden. Diese wurden nun mit jeweils 2 µl der Stocklösungen versetzt und auf die Ansätze auf der 24-Loch Zellkulturplatte überführt.

Es folgte eine Inkubation für 30 min im Brutschrank bei Standardbedingungen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Färbemedium abgesaugt und der Zellrasen mit wenigen Tropfen PBS benetzt, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden.

Unmittelbar im Anschluss erfolgte die beschriebene fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Versuche an einem Umkehrmikroskop.

2.2.9 Rebesiedelungsversuche

Während der Dezellularisierung kamen unterschiedliche Chemikalien zum Einsatz. Es ist daher von einer unterschiedlichen Zusammensetzung auf Proteinebene der Prothesen auszugehen. Dieser variierende Aufbau kann durch Interaktionen zwischen den Zellen und der EZM das Verhalten der Zellen verändern. Es sind

beispielsweise Einflüsse auf die Differenzierung von Stammzellen beschrieben worden [101, 102].

In einem *in vitro* Versuch wurde daher orientierend ermittelt, ob es Unterschiede im Hinblick auf das Adhäsions-, Proliferations- und das Invasionsverhalten von HUVEC in Abhängigkeit von den generierten Prothesen gibt.

Da der Aufbau der Studie lediglich kleine Gruppen (n=2) beinhaltete, zielte die Studie vornehmlich darauf ab Tendenzen zu ermitteln. Auf Grund der besseren Verfügbarkeit, wurde diese Studie ausschließlich an porcinen Probenmaterial durchgeführt. Das eingesetzte Gewebe entsprach dem in 2.2.3 für die kryohistologische Aufarbeitung ausgewählten Material. Es wurden die Gruppen (Nativ, Protokoll 1, Protokoll 2) zu jeweils zwei Zeitpunkten analysiert. Die Zeitpunkte wurden auf zwei und sieben Tage nach Versatz mit der Zellsuspension festgesetzt. Die Gruppengröße betrug n=2 je Gruppe und je Zeitpunkt.

Dazu wurden die Proben in jeweils gleich große Stücke geschnitten und in eine 24-Loch Zellkulturplatte überführt. Zu jeder Probe wurde 1 ml Zellkulturmedium mit 15 000 enthaltenen HUVEC in der 7. Passage gegeben und im Brutschrank bebrütet. Nach 3 bzw. 7 Tagen wurden die Proben aus der Kultur genommen, kryofixiert und für die histologische Aufarbeitung vorbereitet (siehe Abb.5). Es wurden histologische Schnitten angefertigt und mit HE gefärbt. Die Kultur der HUVEC erfolgte wie unter 2.2.8 dargelegt.

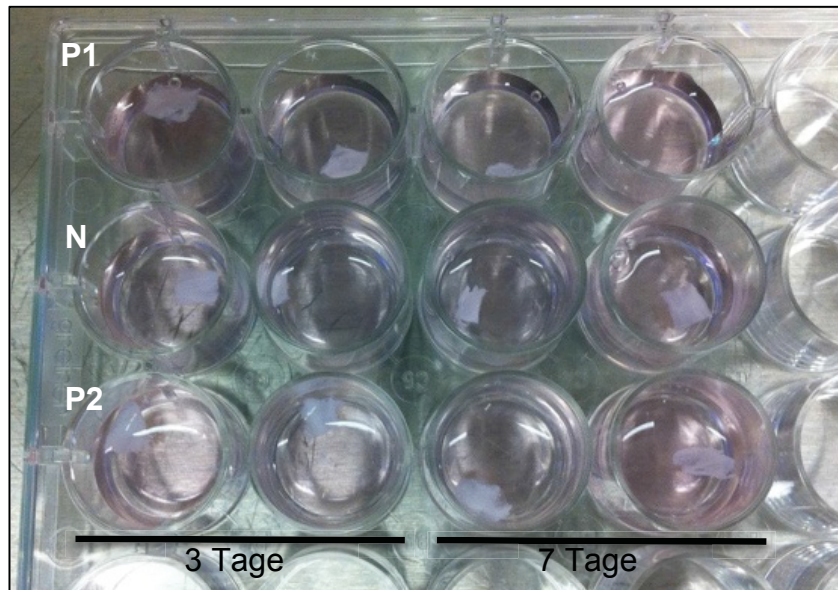


Abb. 5: Makroskopische Aufnahme des Versuchsaufbaus für die Rebesiedelungsversuche. Jeweils horizontal (**P1**) nach Protokoll 1 dezellularisierte Proben; (**N**) native Proben; (**P2**) nach Protokoll 2 dezellularisierte Proben. Die Balken stellen die jeweiligen Zeitpunkte dar. Bei den Proben handelte es sich um mittige Anteile porciner Taschenklappen.

3. Ergebnisse

Aus Gründen der Übersicht wird der Ergebnisteil dieser Arbeit in zwei Abschnitte unterteilt. Zunächst werden die Ergebnisse der Studien an den Aortenkonduits der Spezies Ratte dargestellt, anschließend die Ergebnisse der Proben porcinen Ursprungs. Wie bereits erwähnt wurden im porcinen Teil dieser Studie die Protokolle 1 und 2 evaluiert. Im Studienarm mit Ursprungsgewebe der Spezies Ratte wurden die Protokolle 1 und 3 ausgewertet.

3.1 Studien an Aortenkonduits der Spezies Ratte.

3.1.1 Histologie und Immunhistologie

Für die histologische Auswertung wurde eine Gruppengröße von n=3 Aortenkonduits je Protokoll gewählt. Bei den histologischen Bildern handelt es sich um repräsentativ ausgesuchte Ausschnitte der Präparate in den jeweiligen Vergrößerungen. Es wurden die Regionen A-C (siehe 2.2.1) analysiert und verglichen.

Die Ergebnisse der Optimierungsversuche von Protokoll 2 (Protokolle 4-11) werden verkürzt dargestellt. Hierbei wird der Fokus auf die jeweiligen Schwächen der Protokolle gelegt.

Etablierungsphase

Protokoll 2

Die nach Protokoll 2 dezellularisierten Rattenaortenkonduits zeigten ein heterogenes Bild. In der HE-Färbung stellten sich die luminalen und adventitialen Anteile der Aortenwand azellulär dar. In den mittleren Anteilen der Aortenwand zeigten sich deutliche Kernschatten, welche sich in der DAPI-Färbung deutlich fluoreszierend darstellten und somit als DNA-Anteile identifiziert werden konnten. Die EZM war strukturell intakt. In der Movat-Pentachrom-Färbung zeigte sich das Kollegennetz dicht und zirkulär ausgerichtet bei nur geringen grünlichen Farbanteilen der EZM (Siehe Abb. 6).

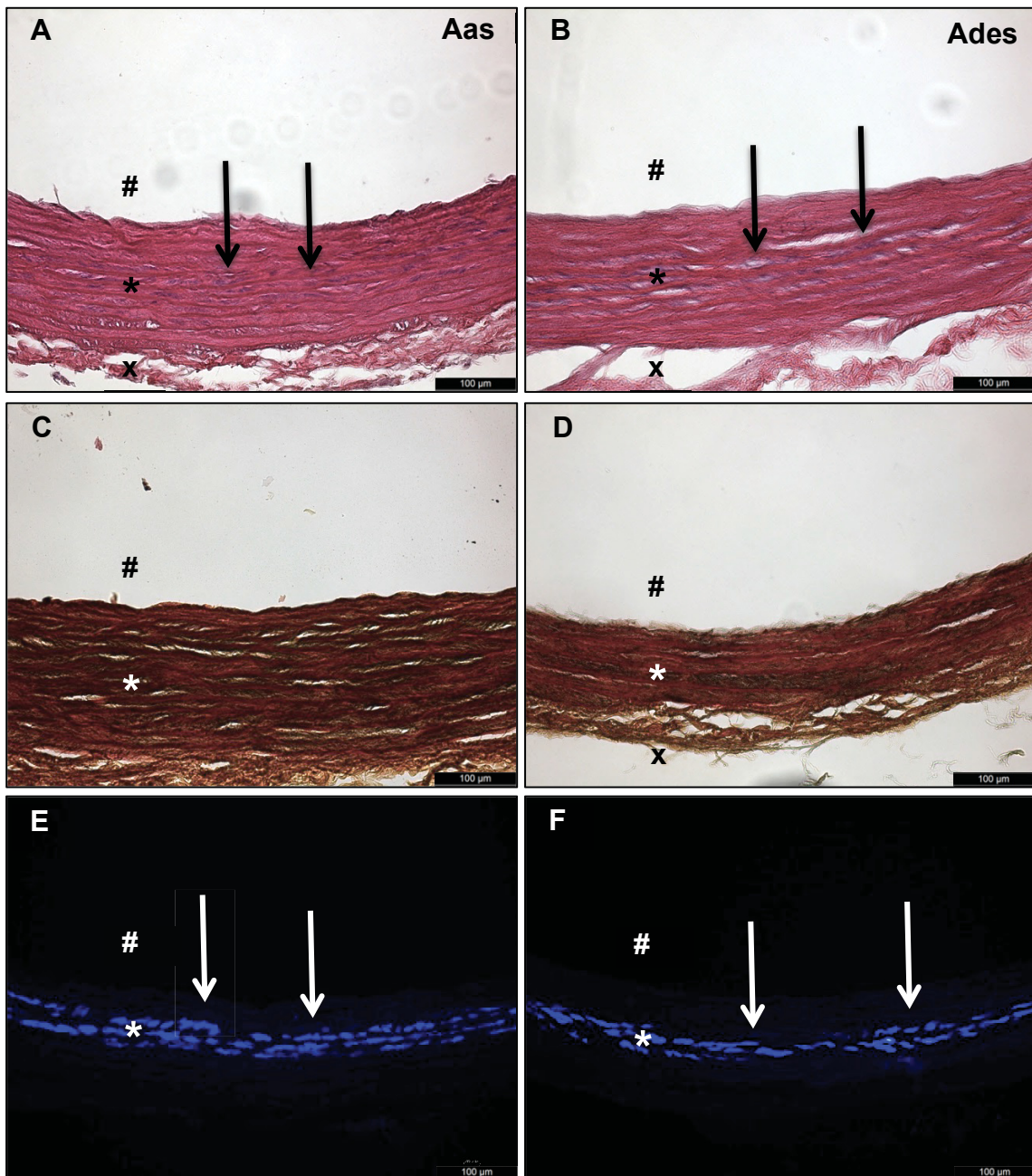


Abb. 6: Histologische Auswertung (HE-, Movat-Pentachrom-, DAPI-Färbung) der Aortenwand nach Anwendung von Protokoll 2. (A),(C),(E) Aorta Asc. (Region B), (B),(D),(F) Aorta Desc. (Region C). Mit (#) markiert ist das Lumen, (*) markiert den Bereich der Media, (x) markiert die adventitiellen Anteile. Die (Pfeile) markieren Zellresiduen im Bereich der Media. In (E) und (F) werden DNA-Residuen dargestellt. (A-F) 200x vergrößert (Maßstab 100 µm).

Auf Höhe der Ansätze der Taschenklappen waren, bei ansonsten gutem Strukturerehalt, deutliche Zellresiduen zu erkennen. Die DAPI-Färbung zeigte stellenweise positive Signale (Abb. 7).

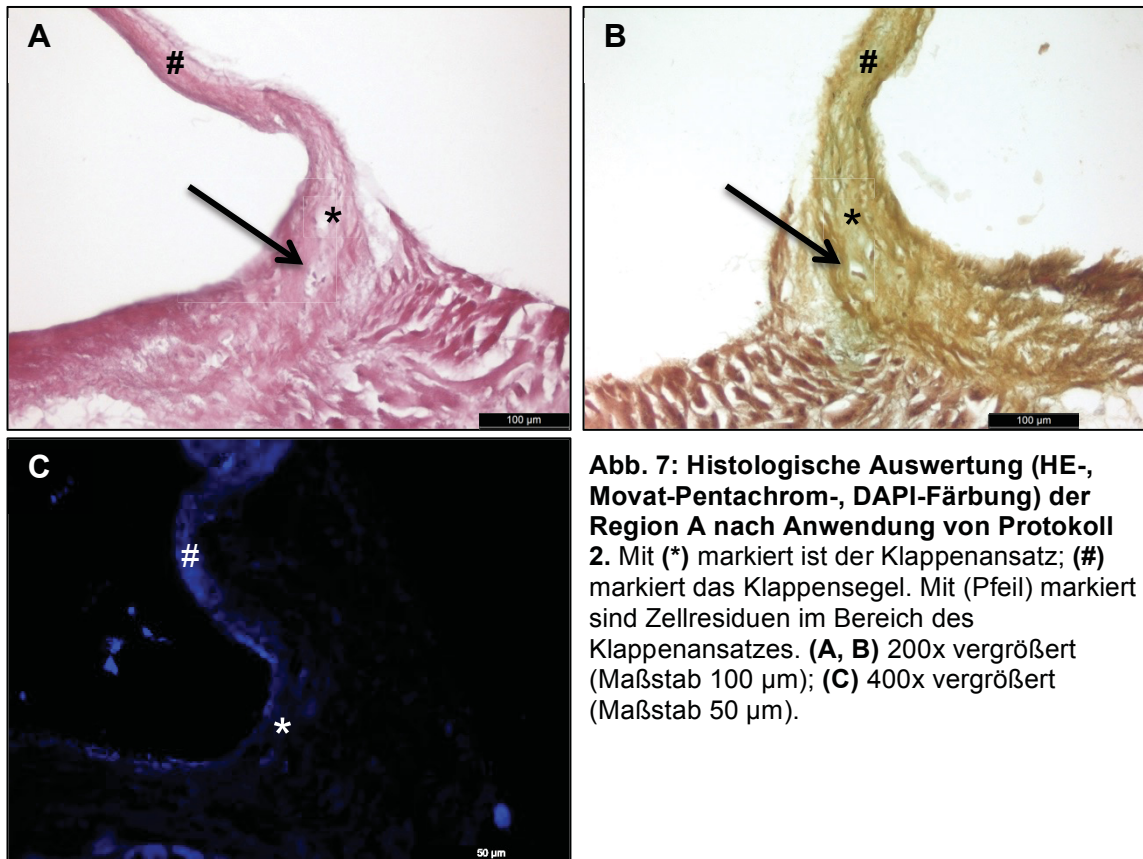


Abb. 7: Histologische Auswertung (HE-, Movat-Pentachrom-, DAPI-Färbung) der Region A nach Anwendung von Protokoll 2. Mit (*) markiert ist der Klappenansatz; (#) markiert das Klappensegel. Mit (Pfeil) markiert sind Zellresiduen im Bereich des Klappenansatzes. (A, B) 200x vergrößert (Maßstab 100 µm); (C) 400x vergrößert (Maßstab 50 µm).

Protokoll 4

Nach Anwendung von Protokoll 4 war die Aortenwand in der HE-Färbung kompakt und gut erhalten. Sowohl die luminalen als auch die adventitiellen Anteile waren glatt begrenzt und deutlich abgrenzbar. Die Media zeigte keine größeren Defekte. Basophile Einlagerungen waren jedoch in der Media der Aortenwand zu beobachten. In der DAPI-Färbung zeigten sich eine Vielzahl positiver Signale als Hinweis auf DNA-Residuen im Bereich der Media (siehe Abb. 8).

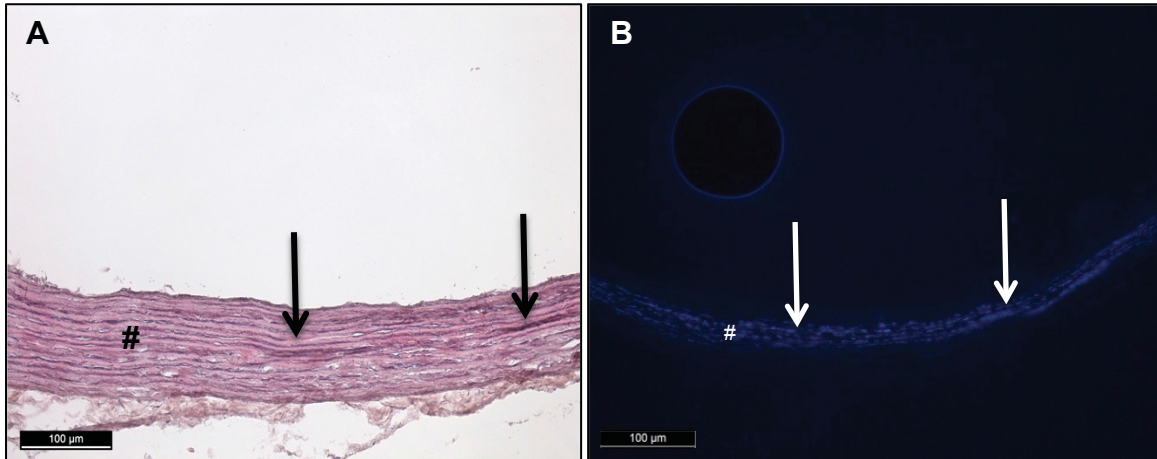


Abb. 8: Histologische Auswertung von Protokoll 4. (A) HE-Färbung von Region B, 200x (Maßstab 100 µm). Mit (#) markiert ist die Media der Aortenwand. (**Pfeil**) markiert basophile Einlagerungen. **(B)** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme der DAPI-gefärbten Region B, 100x (Maßstab 100 µm). Mit (**Pfeil**) markiert sind fluoreszierende Signale als Nachweis von DNA.

Protokoll 5

Das morphologische Bild der Präparate in der HE-Färbung nach Durchlauf von Protokoll 5 mit verlängerter Anwendung von DNase ähnelte dem Bild der Gruppe Protokoll 4. Bei gutem Strukturerhalt waren auch hier deutliche basophile angefärbte Strukturen mit Schwerpunkt im Bereich der Media (siehe Abb. 9) zu erkennen. Die DAPI-Färbung zeigte ebenfalls positive Signale im Bereich der Media. Diese waren jedoch im Vergleich zu Protokoll 4 deutlich reduziert.

Protokoll 6

Das Protokoll 6 zeichnete sich durch eine Kombination von Protokoll 2 und dem Einsatz von Detergenzien (SDS, DCA) als ersten Schritt aus. Die Aortenwand war in der HE-Färbung frei von Zellkern- ähnlichen Strukturen oder basophilen Einlagerungen. Im Bereich der Media zeigten sich jedoch sowohl das Kollagenetz als auch die elastischen Fasern wellenartig konfiguriert. Ferner waren in einigen Abschnitten Defekte in der Matrix zu erkennen. Insbesondere unterhalb der Adventitia zeigten sich deutliche Risse in der Aortenwand. Die DAPI-Färbung zeigte keinerlei positive Signale (siehe Abb. 10).

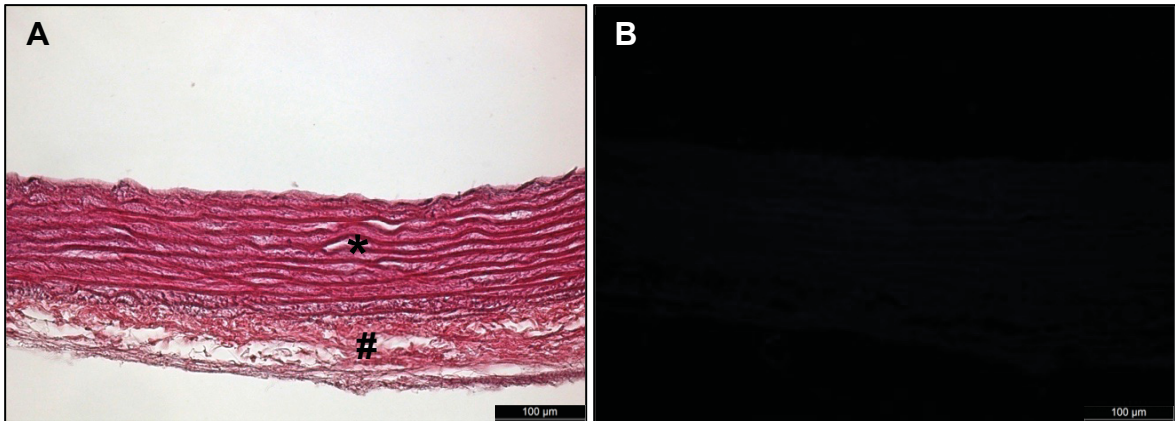


Abb. 10: Histologische Auswertung von Protokoll 6. (A) HE-Färbung der Region B 200x vergrößert (Maßstab 100 µm); **(B)** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme der DAPI-gefärbten Region B 200x vergrößert (Maßstab 100 µm). Mit **(#)** markiert ist die Destruktion der EZM nahe der Adventitia; **(*)** markiert die wellenartige Konfiguration der elastischen Fasern. In **(B)** sind keine Signale erkennbar.

Protokoll 7

Das Protokoll 7 variierte den Zeitpunkt für den Einsatz der Detergenzien. Dieser erfolgte im Vergleich zu Protokoll 6 im Anschluss an die Behandlung mit Latrunculin B (siehe Methodenteil dieser Arbeit). Die Aortenwand imponierte zellfrei bei gleichzeitigem Auftreten der vielfach beobachteten basophilen Schlieren mit der stärksten Ausprägung im Bereich der Media. Die DAPI-Färbung ergab keine positiven Signale. Darüber hinaus zeigten sich größere Defekte der EZM mit stellenweisen Ablösen von Bestandteilen der Aortenwand (siehe Abb. 11).

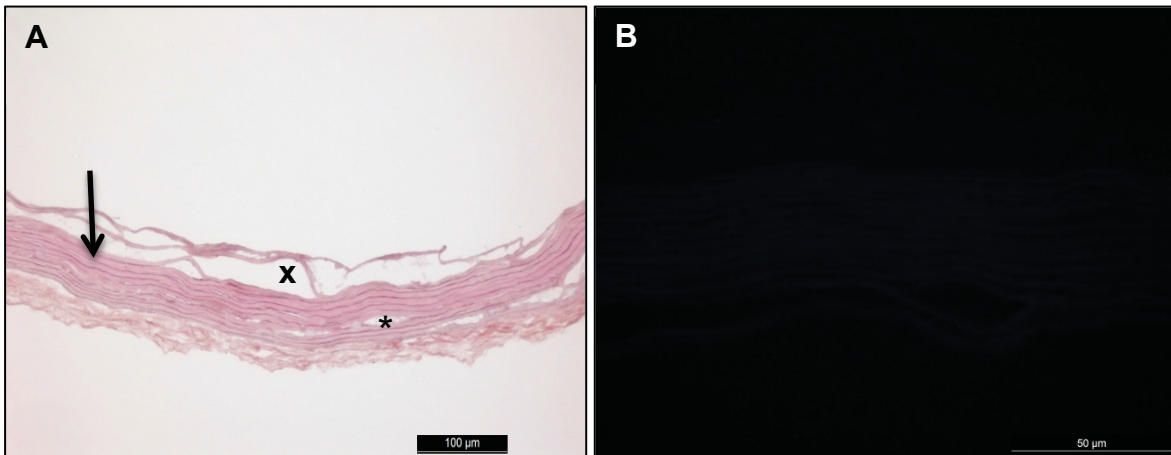


Abb. 11: Histologische Auswertung von Protokoll 7. (A) HE-Färbung der Region B 200x vergrößert (Maßstab 100 µm); (B) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme der DAPI-gefärbten Region B 400x vergrößert (Maßstab 50 µm). Mit (x) markiert ist die Destruktion der EZM im Bereich der Intima; (*) markiert einen Defekt im Bereich der Media. (Pfeil) markiert basophile Ablagerungen. In (B) sind keine Signale erkenntlich.

Protokoll 8

Das Protokoll 8 beinhaltete eine weitere Variation des Einsatzzeitpunktes der Detergenzien. Das histologische Erscheinungsbild zeigte eine große Ähnlichkeit mit Protokoll 7. Typische Zellkörper waren in der HE-Färbung nicht erkennbar, basophile Ablagerungen über die gesamte Wand waren jedoch erkennbar. In der DAPI-Färbung waren keine positiven Signale erkenntlich. Die EZM zeigte sich auch hier abschnittsweise stark destruiert mit einer Ablösung der Intima (siehe Abb. 12).

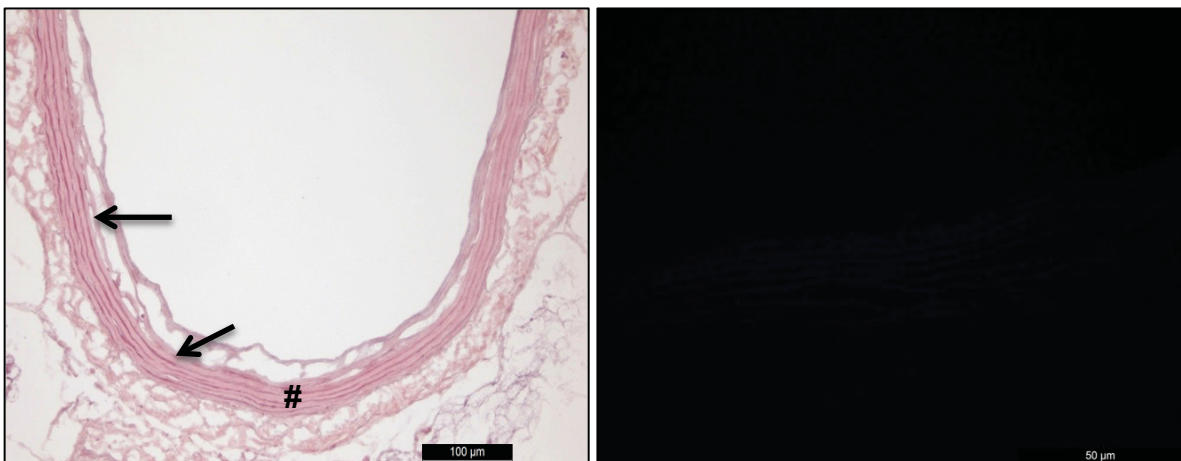


Abb. 12: Histologische Auswertung von Protokoll 8. (A) HE-Färbung der Region C 200x vergrößert (Maßstab 100 µm); (B) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme der DAPI-gefärbten Region C 400x vergrößert (Maßstab 50 µm) (Pfeil) markiert sind basophile Ablagerungen; (#) kennzeichnet die Ablösung der Intima. In (B) waren keine Signale zu beobachten.

Protokoll 9

Bei histomorphologischer Azellularität und dem Ausbleiben positiver Signale in der DAPI-Färbung, führte die Anwendung von Protokoll 9 zu einer massiven Destruktion der Aortenwand. Die gesamte Aortenwand stellte sich wabenförmig erweitert dar, der charakteristische Aufbau war aufgehoben (siehe Abb. 13).

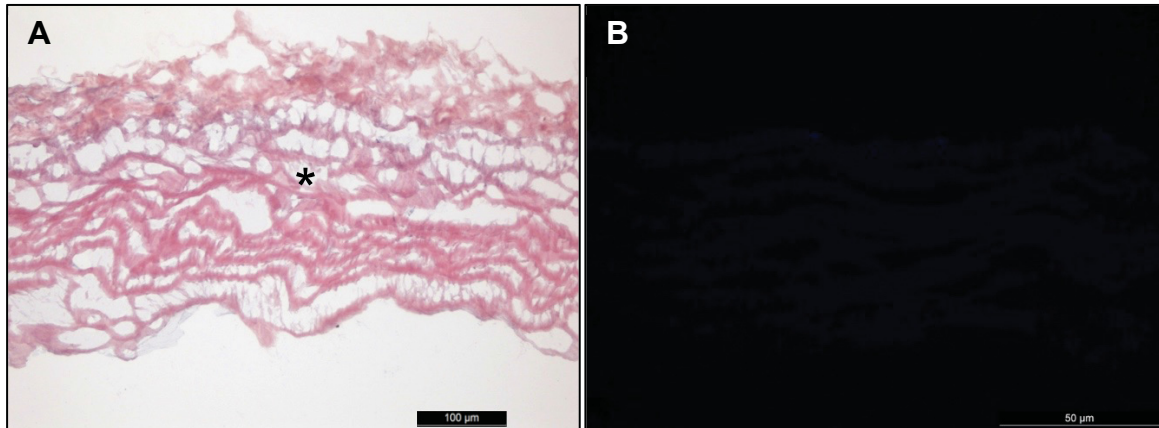


Abb. 13: Histologische Auswertung von Protokoll 9. (A) HE-Färbung der Region B 200x vergrößert (Maßstab 100 µm); (B) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme der DAPI-gefärbten Region B 400x vergrößert (Maßstab 50 µm) (*) markiert die massive Destruktion der EZM im Bereich der Media. In (B) waren keine Signale zu beobachten.

Protokoll 10

Im Rahmen von Protokoll 10 wurde als Erweiterung von Protokoll 2 Triton X-100 eingesetzt. Zellfreiheit in der histologischen Auswertung konnte hierdurch jedoch nicht erreicht werden. Analog zu den Ergebnissen von Protokoll 2 zeigten sich im Bereich der Media deutliche Zellresiduen, welche in der DAPI-Färbung deutlich fluoreszierten (siehe Abb. 14).

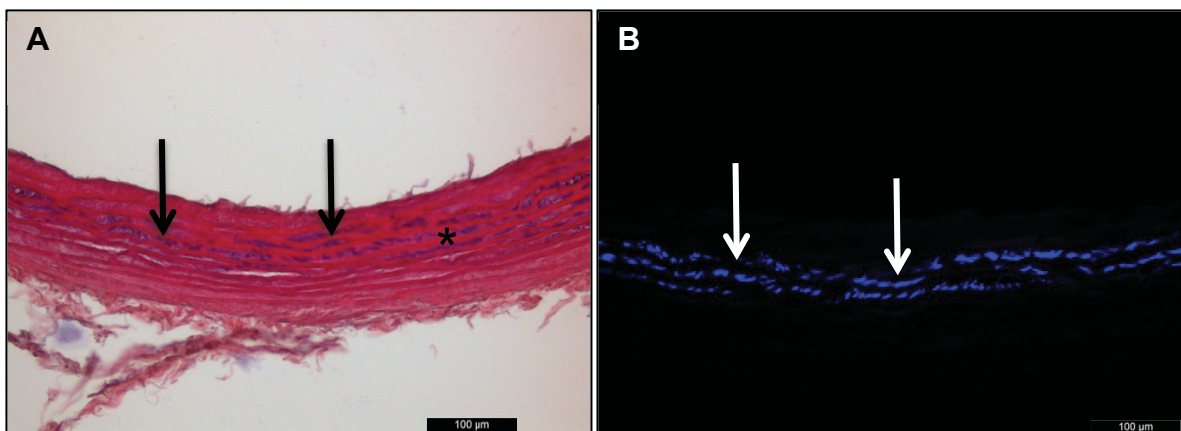


Abb. 14: Histologische Auswertung von Protokoll 10. (A) HE-Färbung der Region B 200x vergrößert (Maßstab 100 µm); (B) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme der DAPI-gefärbten Region B 200x vergrößert (Maßstab 100 µm); (*) markiert die Media; die (Pfeile) zeigen Zellkernresiduen in der HE-Färbung und positive Signale in der DAPI-Färbung.

Protokoll 11

Die Dauer einzelner Schritte von Protokoll 2 wurde in Protokoll 11 verändert. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Protokoll 2 konnte hierdurch die Anzahl der Zellresiduen im Bereich der Media deutlich reduziert werden. Darüberhinaus waren diese in der DAPI-Färbung nunmehr nicht länger zellkörpertypisch konfiguriert. Die EZM zeigte sich gut erhalten, im Vergleich zu Protokoll 2 fiel jedoch eine Erweiterung und Fragmentierung des Kollagenetzes im Bereich der Intima und an die Adventitia angrenzend auf (siehe Abb. 15).

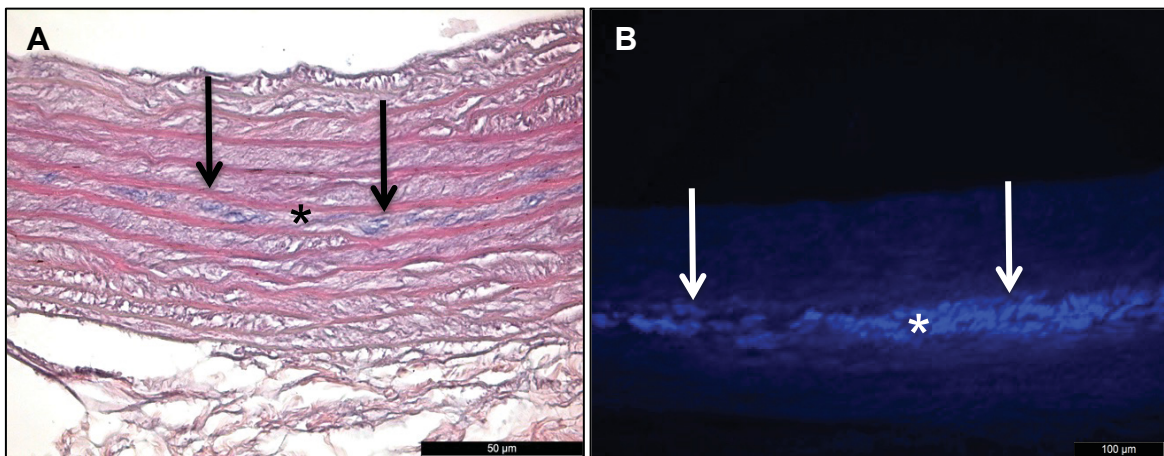


Abb. 15: Histologische Auswertung von Protokoll 11. (A) HE-Färbung der Region B 400x vergrößert (Maßstab 50 µm); **(B)** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme der DAPI-gefärbten Region B 200x vergrößert (Maßstab 100 µm); (*) markiert die Media; die **(Pfeile)** zeigen basophile Zellresiduen in der HE-Färbung und positive Signale in der DAPI-Färbung, welche keine zelltypische Konfiguration aufweisen.

Protokoll 1 und Protokoll 3

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die nach Protokoll 1 und Protokoll 3 behandelten Proben imponierten in der HE-Färbung über sämtliche Regionen morphologisch frei von basophilen, zellkerntypischen Strukturen. Die Proben der Gruppe Protokoll 1 färbten sich im Vergleich zu Protokoll 3 ubiquitär basophiler an.

In der Region A stellte sich in beiden Gruppen die EZM im Bereich der Klappenansätze bei Erhalt des strukturellen architektonischen Aufbaus mitunter wabenförmig erweitert dar. Die Taschenklappen waren morphologisch bei beiden Protokollen intakt (siehe Abb. 16a).

Die Region B zeigte über die gesamte Aortenwand ein homogenes Bild. In beiden Gruppen war die zirkuläre Ausrichtung des Fasergerüsts konserviert. Dieses war jedoch streckenweise wellenförmig konfiguriert und geringfügig erweitert. Zwischen der Region B und C zeigten sich in beiden Gruppen keine wesentlichen morphologischen Unterschiede.

Die Proben der Gruppe Protokoll 1 zeigten in den Regionen B und C über weite Abschnitte basophil angefärbte Schlieren zwischen den Lamellen der Matrix (siehe Abb. 16b). In Protokoll 3 war dies nicht zu beobachten.

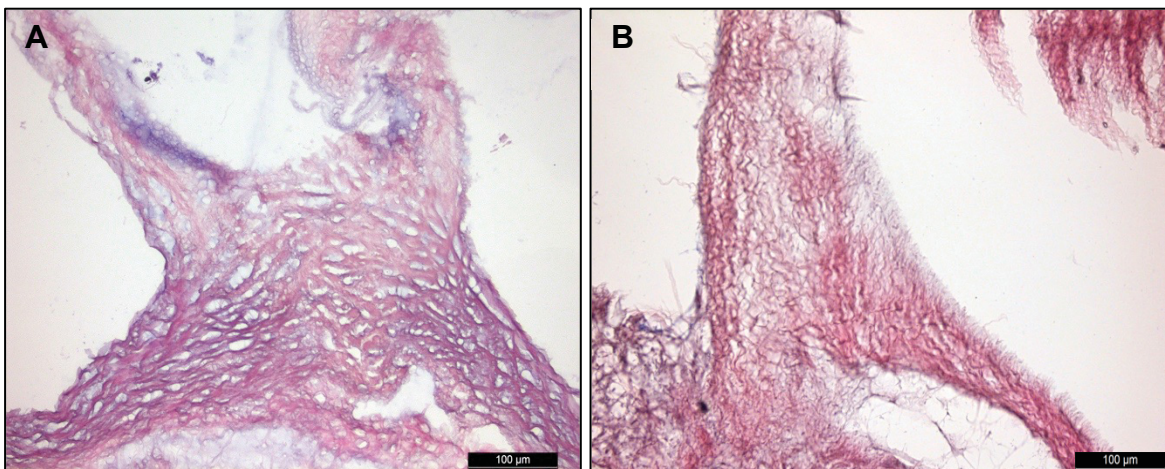


Abb. 16a: Histologische Auswertung der Region A der Protokolle 1 und 3. (A) zeigt exemplarisch den Klappenansatz eines nach Protokoll 1 dezellulierten Aortenkonduits; **(B)** wurde gemäß Protokoll 3 dezelluliert. **(A, B)** 200x vergrößert (Maßstab 100 µm).

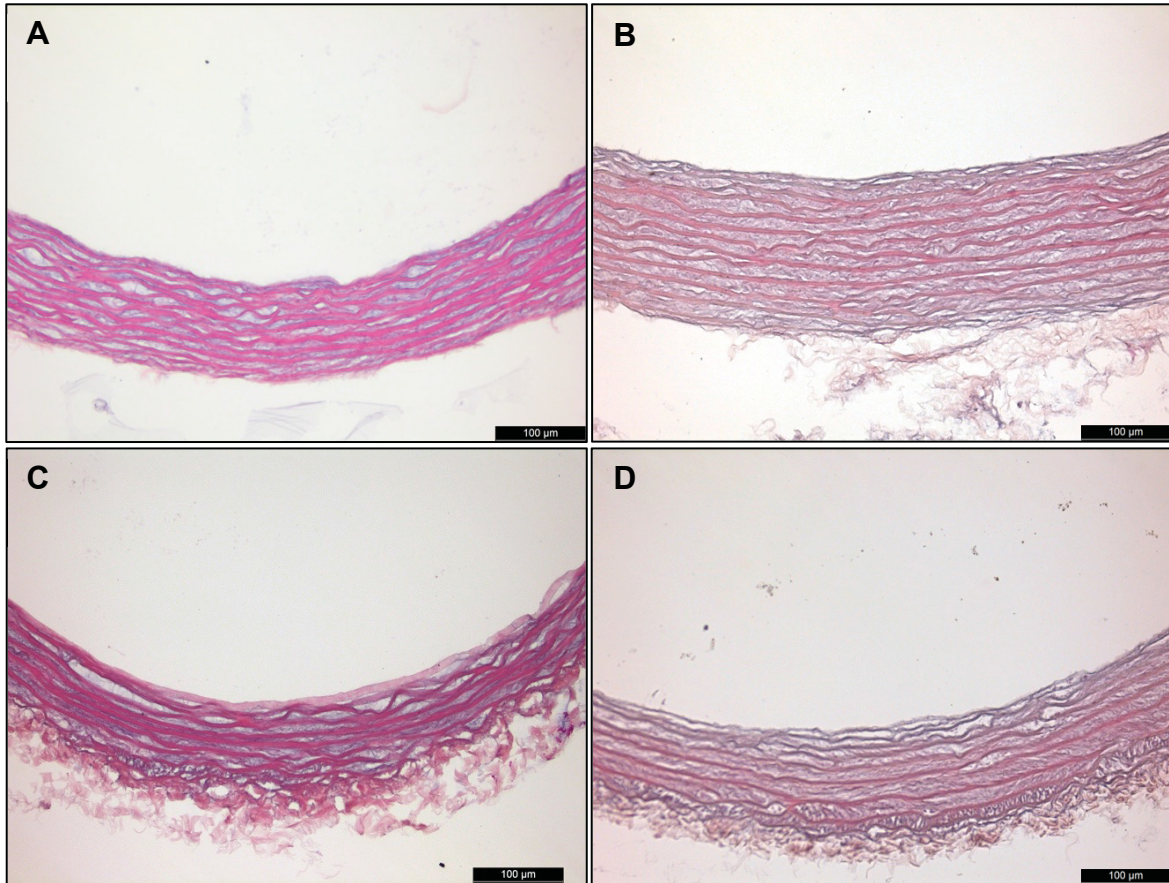


Abb. 16b: Histologische Auswertung der Region B und C der Protokolle 1 und 3 über die HE-Färbung. (A) und (B) stellen exemplarisch Region B dar; (C) und (D) sind repräsentative Ausschnitte der Region C. Links (A,C) nach Protokoll 1 dezellularisiert; rechts (B,D) nach Protokoll 3 dezellularisiert. (A-D) 200x vergrößert (Maßstab 100 µm). (A) und (B) mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Ltd. Lizenznummer: 4030950585627.

Movat-Pentachrom-Färbung

Die morphologische Untersuchung der Movat-Pentachrom-Färbung zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen Protokoll 1 und Protokoll 3.

Kollagene stellen sich in der Färbung gelblich dar, GAG grün, elastische Fasern bräunlich bis rot, Zellkerne dunkelblau bis schwarz.

Die Integrität der strukturellen Architektur zeigte sich in dieser Färbung, wie bereits in der HE-Färbung beobachtet, bei beiden Gruppen erhalten. Zellkerntypische, rundlich bis ovale schwarze Strukturen waren nicht erkennbar, die Matrix war azellulär.

In Protokoll 3 war ein deutlicher GAG-Verlust erkennbar. In den Regionen B und C war der Grünanteil deutlich reduziert. In der Region A fehlte dieser komplett. Das Kollagennetz war in der Gruppe Protokoll 3 im Vergleich zu Protokoll 1 dichter.

In den Regionen B und C war der Erhalt der elastischen Fasern der Aortenwand in beiden Gruppen deutlich erkennbar (Siehe Abb. 17).

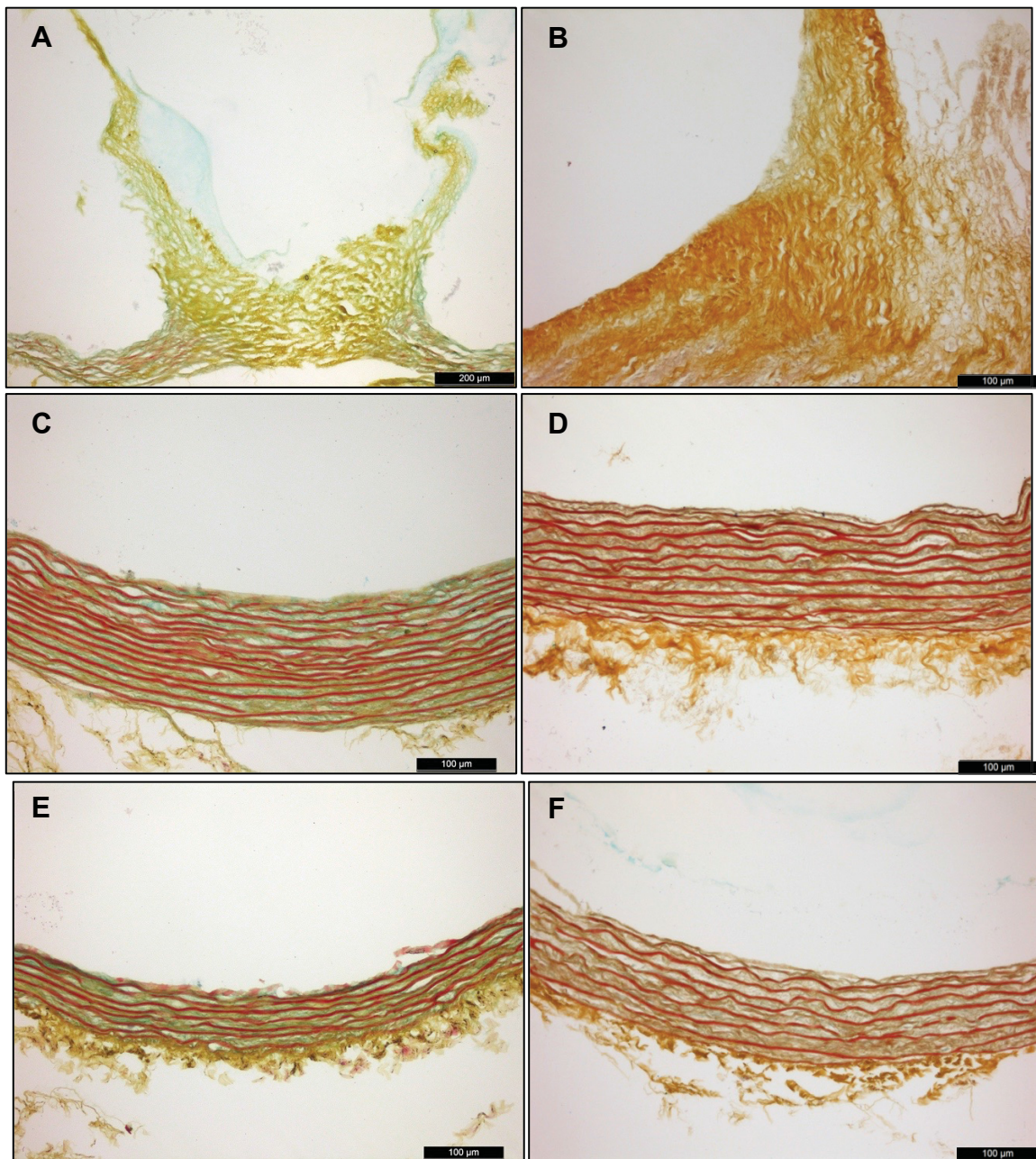


Abb. 17: Histologische Auswertung der Region A, B und C der Protokolle 1 und 3 über die Movat-Pentachrom-Färbung. (A), (C), (E) Protokoll 1; (B), (D), (F) Protokoll 3. (A), (B) entsprechen Region A; bei (C), (D) handelt es sich um die Region B; (E), (F) zeigen Region C. (A) 100x vergrößert (Maßstab 200 µm); (B-F) 200x vergrößert (Maßstab 100 µm). (B), (C) und (D) mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Ltd. Lizenznummer: 4030950585627.

4',6-Diamidin-2-Phenylindol-Färbung

Die DAPI-Färbung ermöglicht die Darstellung von DNA-Anteilen und die Lokalisation dieser in histologischen Schnitten. Der Vergleich beider Gruppen zeigte hier über allen Regionen den Verbleib von DNA-Anteilen in der Gruppe Protokoll 1. Die in der HE-Färbung in den Regionen B und C identifizierten Schlieren im Bereich der Media zeigten ein deutlich positives Signal. Die Konfiguration der Signale entsprach jedoch nicht der Morphologie typischer

Zellkerne. Es liegt nahe, dass es sich hier um fragmentierte DNA handelte (siehe Abb. 18).

Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung von Kollagen IV zeigte den Erhalt der Basallamina in beiden Gruppen. Über den Verlauf der Aortenwand sowie im Bereich der Aortenklappenregion war luminal in beiden Gruppen ein deutlich positives Signal erkenntlich (siehe Abb. 19).

In den Regionen B und C fiel ein im Vergleich zur nativen Kontrollgruppe luminal verbreitetes Kollagen IV Signal auf. Darüberhinaus waren stellenweise positive Kollagen IV Signale im Bereich der Adventitia und Media zu beobachten. Dies könnte für eine Versprengung von Kollagen IV Anteilen in diese Bereiche sprechen.

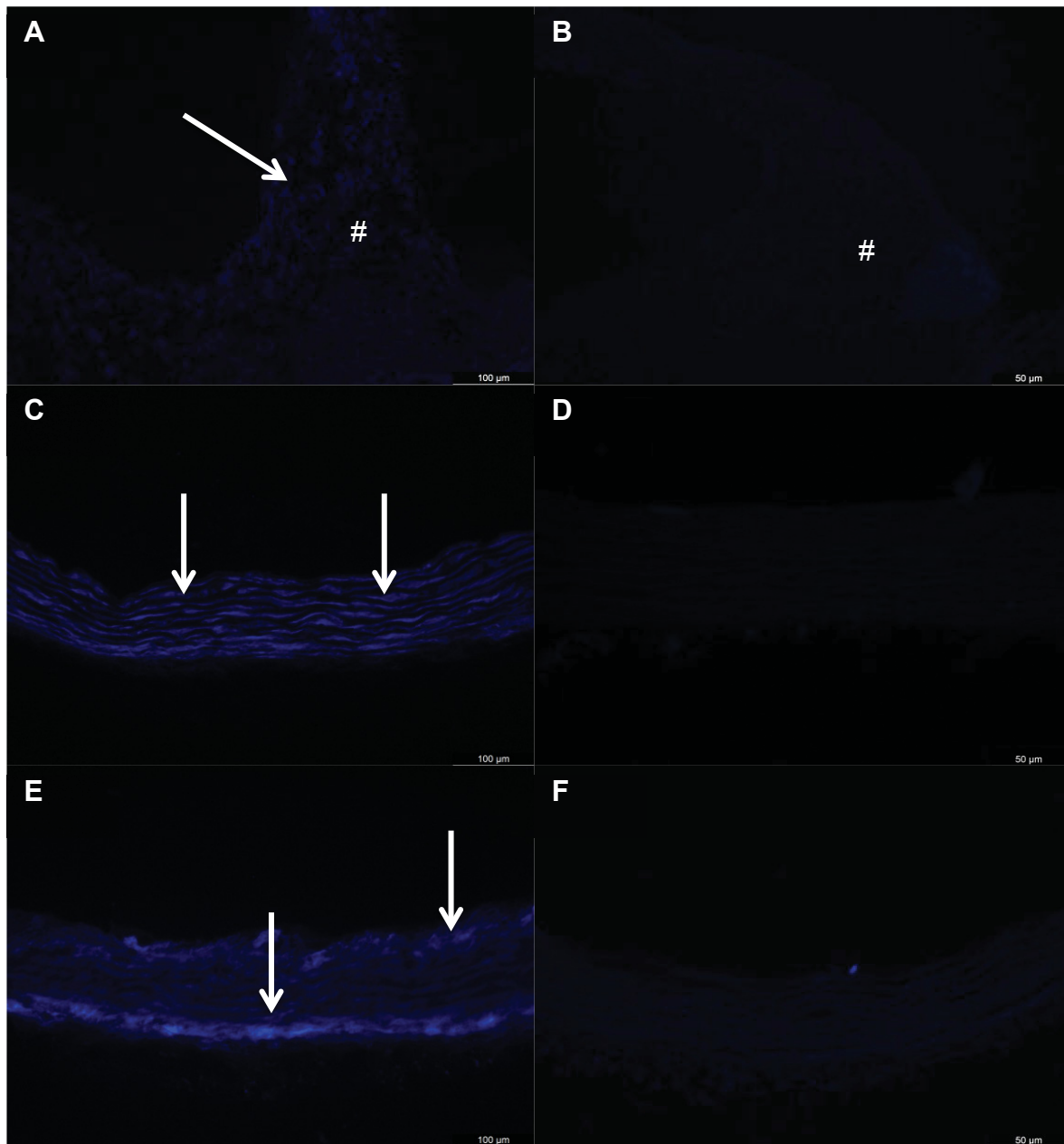


Abb. 18: Histologische Auswertung der Region A, B und C der Protokolle 1 und 3 über die DAPI-Färbung. (A), (C), (E) Protokoll 1; (B), (D), (F) Protokoll 3. (A), (B) entsprechen Region A; bei (C), (D) handelt es sich um die Region B; (E), (F) zeigen Region (C). Mit (#) markiert ist der Aortenklappenansatz, die (Pfeile) markieren fluoreszierende Signale. (B), (D), (F) zeigten keine fluoreszierende Signale. (A-F) 200x vergrößert (Maßstab 100 μm).

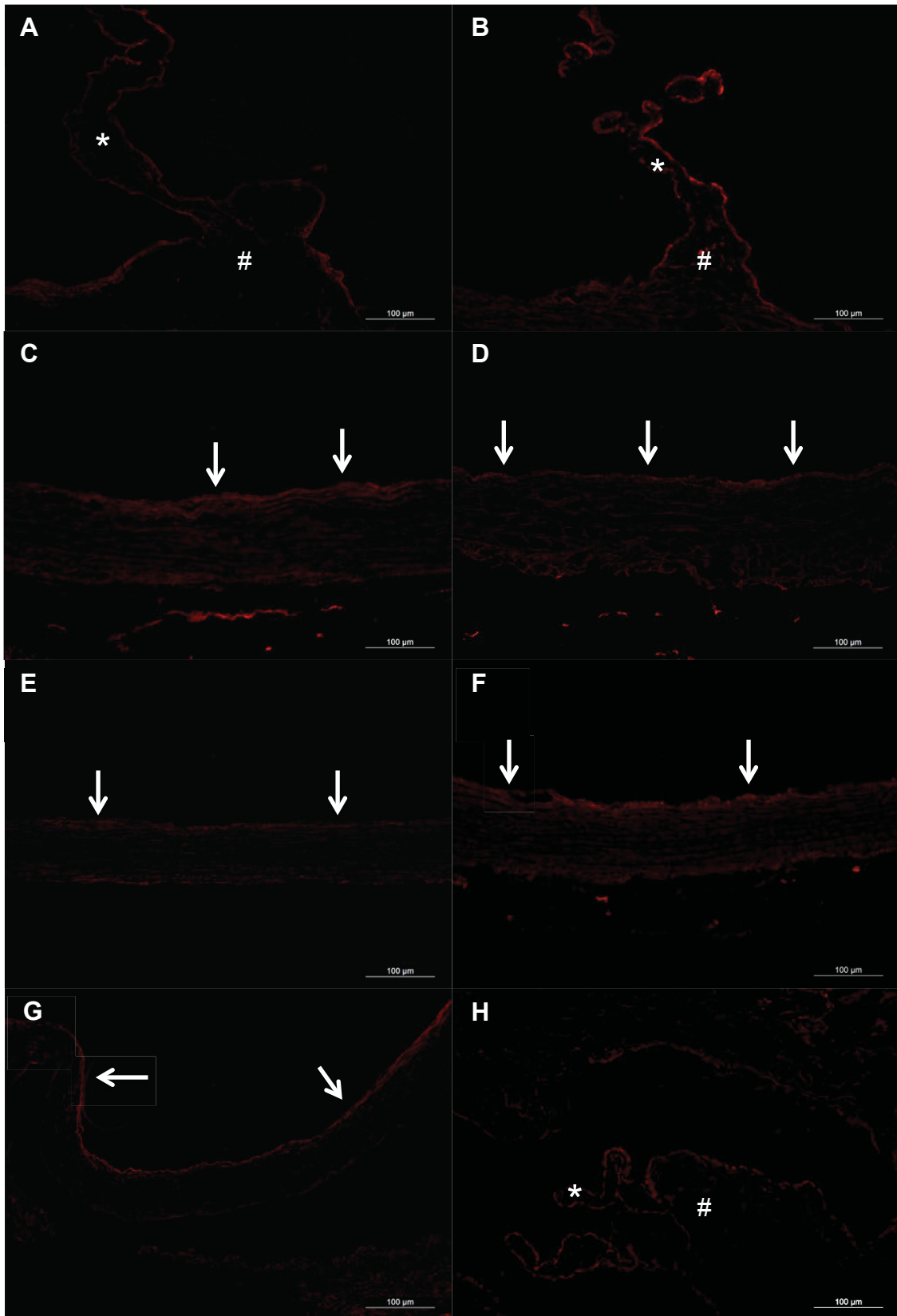


Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Regionen A, B und C der Protokolle 1 und 3 sowie nativer Präparate nach Markierung von Kollagen IV über die indirekte Immunfluoreszenz. (A), (C), (E) Protokoll 1; (B), (D), (F) Protokoll 3; (G), (H) native Präparate. (A), (B), (H) entsprechen Region A; bei (C), (D), (G) handelt es sich um die Region B; (E), (F) zeigen Region (C). Mit (#) markiert ist der Aortenklappenansatz, (*) markiert das Aortenklappensegel; die (Pfeile) zeigen markiertes, rot fluoreszierendes Kollagen IV als Teil der Basalmembran. (A-H) 200x vergrößert (Maßstab 100 µm). (A) mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Ltd. Lizenznummer: 4030950585627.

3.1.2 Relativer Kollagengehalt

Die Bestimmung des relativen Kollagengehaltes am Gesamtproteingehalt ergab einen signifikanten Unterschied des Kollagenanteiles zwischen den Gruppen Protokoll 1 und 3 (Gruppengröße n=3). Während für die Gruppe Protokoll 1 ein Kollagenanteil von 93,38% im Mittel ermittelt wurde, betrug dieser in der Gruppe Protokoll 3 95,55%. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. Für die native Kontrollgruppe wurde ein Mittelwert von 93,94% bestimmt. Es ergab sich keine eindeutige statistische Signifikanz zu der Versuchsgruppe Protokoll 1, zu der Versuchsgruppe Protokoll 3 betrug das Signifikanzniveau $p < 0,01$.

Da das Verhältnis Kollagenproteine zu nicht-Kollagenproteinen gemessen wurde, gibt es zwei Möglichkeiten für die beobachteten Unterschiede zwischen Protokoll 1 und 3. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass es in der Gruppe Protokoll 3 zu einem höheren Verlust von nicht-Kollagenproteinen kommt, zum anderen könnten die Veränderungen durch eine bessere Konservierung der Kollagenproteine erklärt werden. In der histologischen Auswertung über die Movat-Pentachrom-Färbung wurde in der Gruppe Protokoll 3 ein kompakteres Kollagengrundgerüst gesehen. Dies legt letzteren Erklärungsansatz nahe.

Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 20 dargestellt, Details der statistischen Auswertung sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

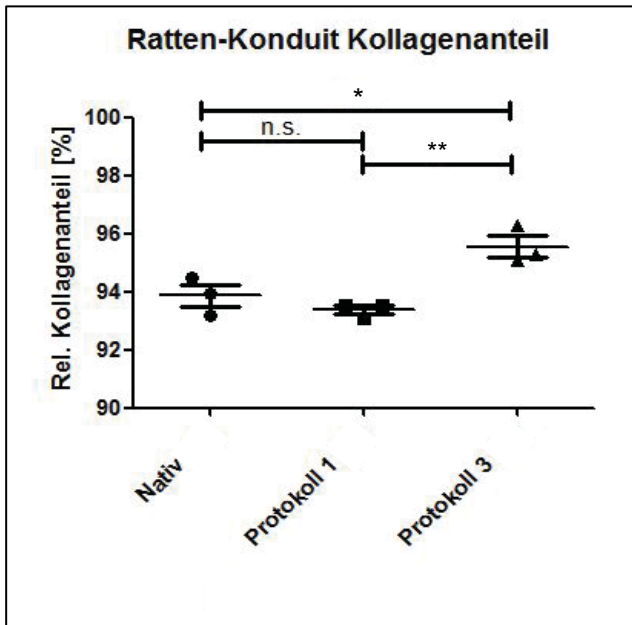


Abb. 20: Graphische Darstellung des relativen Kollagenanteils. Die Gruppengröße beträgt n=3; (*) steht für eine Signifikanz von $p < 0,05$; (**) entspricht $p < 0,01$; (n.s.) = „nicht signifikant“. Fehlerbalken +/- SEM; mittlerer Balken MV.

	Mittelwert [%]	Standardfehler [%]	Maximum [%]	Minimum [%]
Nativ	93,87	0,47	94,49	93,18
Prot. 1	93,38	0,17	93,54	93,1
Prot. 3	95,55	0,46	96,28	95,09

Tabelle 4: Relativer Kollagenanteil der Proben der Spezies Ratte.

3.1.3 Glykosaminoglykangehalt

Bei einer Probenanzahl von n=5 je Gruppe konnte in den Gruppen Protokoll 1 und 3 im Vergleich zur nativer Kontrollgruppe ein deutlicher GAG-Verlust nachgewiesen werden. Nachfolgende Mittelwerte wurden ermittelt: Nativ 258,2 $\mu\text{g/g}$; Protokoll 1: 91,6 $\mu\text{g/g}$; Protokoll 3: 40,9 $\mu\text{g/g}$. Die Unterschiede zu der nativen Kontrollgruppe waren jeweils signifikant (Nativ/Protokoll 1: $p < 0,001$; Nativ/Protokoll 3: $p < 0,001$).

Der histologische Vergleich zwischen den Gruppen Protokoll 1 und 3 legte auf Grund eines deutlich geringeren Grünanteils in der Movat-Pentachrom-Färbung einen geringeren Gehalt an GAG in der Gruppe Protokoll 3 nahe.

Der quantitativ ermittelte mittlere GAG-Gehalt lag in der Gruppe Protokoll 3 um mehr als 50% unter dem der Gruppe Protokoll 1. Trotz nicht hinreichender statistischer Signifikanz stützen die Ergebnisse in Zusammenschau mit den

Resultaten der Histologie die These eines geringeren GAG-Gehalts in den Proben der Gruppe Protokoll 3 im Vergleich zu den Proben der Gruppe Protokoll 1.

Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 21 dargestellt, die statistische Auswertung ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

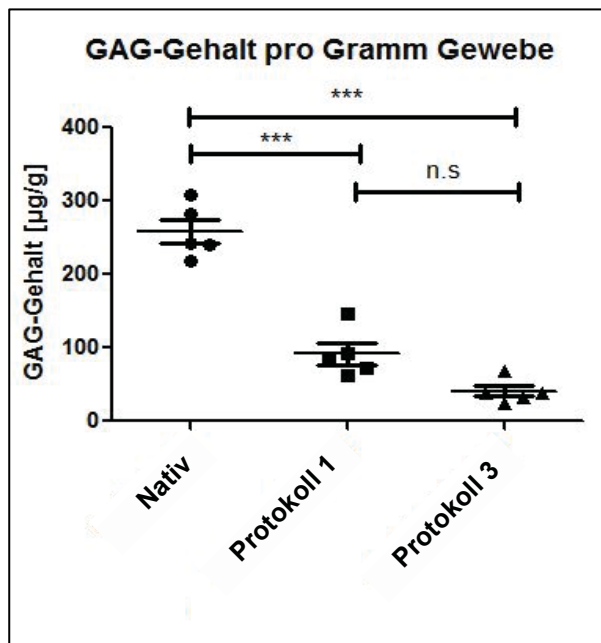


Abb. 21: Graphische Darstellung des GAG-Gehalts. Die Gruppengröße beträgt n=5; (***) steht für eine Signifikanz von $p < 0,001$; (n.s.) = „nicht signifikant“. Fehlerbalken +/- SEM; mittlerer Balken MV.

	Mittelwert [$\mu\text{g/g}$]	Standardfehler [$\mu\text{g/g}$]	Maximum [$\mu\text{g/g}$]	Minimum [$\mu\text{g/g}$]
Nativ	258,24	18,35	308,6	217,41
Prot. 1	91,57	33,02	147,18	62,84
Prot. 3	40,86	8,28	68,65	24,88

Tabelle 5: GAG-Gehalt, Messwerte und statistische Auswertung.

3.1.4 DNA-Konzentration

In der histologischen Auswertung hatten sich sowohl in der HE-Färbung als auch in der DAPI-Färbung in den nach Protokoll 1 behandelten Proben Hinweise für einen Verbleib von DNA-Anteilen ergeben.

Die quantitative Bestimmung des DNA-Gehaltes erlaubte es, diese Unterschiede weiter zu bestätigen. Hierbei erwies sich der zweimalige Einsatz von DNase in Protokoll 3 als äußerst effektiv. Im Mittel konnte eine Reduktion des DNA-Gehaltes der Proben im Vergleich zur Nativkontrolle von über 99% von 0,79 $\mu\text{g/mg}$ auf

0,006 µg/mg erreicht werden. In der Gruppe Protokoll 1 betrug die Reduktion im Mittel 44% auf einen Mittelwert von 0,44 µg/mg. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 22 dargestellt, Details der statistischen Auswertung sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Die ermittelten Unterschiede waren bei einer Probenanzahl von n=3 je Gruppe statistisch signifikant. Die Signifikanzniveaus sind Abb. 22 zu entnehmen.

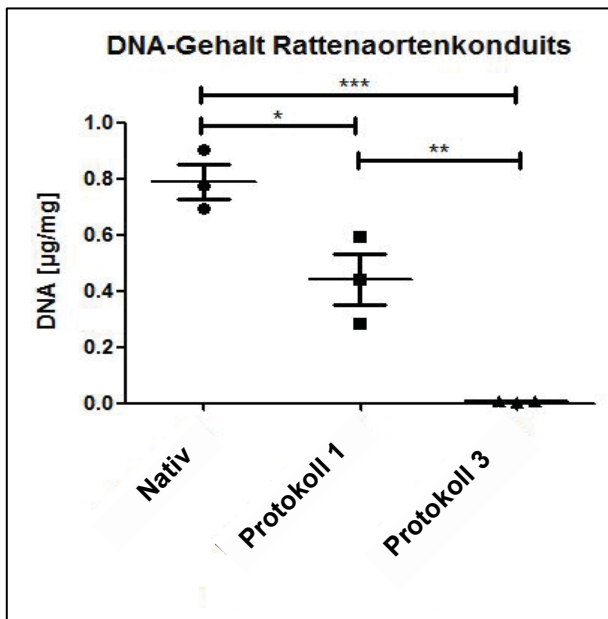


Abb. 22: Graphische Darstellung des DNA-Gehalts. Die Gruppengröße beträgt n=3; (*) entspricht p<0,05; (**) entspricht p<0,01 (***) entspricht p<0,001; (n.s.) = „nicht signifikant“. Fehlerbalken +/- SEM; mittlerer Balken MV.

	Mittelwert [µg/mg]	Standardfehler [µg/mg]	Maximum [µg/mg]	Minimum [µg/mg]
Nativ	0,792	0,076	0,907	0,693
Prot. 1	0,44	0,111	0,597	0,44
Prot. 3	0,006	0,001	0,007	0,004

Tabelle 6: DNA-Gehalt der Rattenaortenkonduits, Messwerte und statistische Auswertung.

3.1.5 Proteinanalyse über Western Blot

Die Proteinanalyse über *Western Blot* ermöglicht den gezielten Nachweis von spezifischen Proteinen in Geweben. Durch die Analyse des dezellularisierten Gewebes können verbliebene intrazelluläre Proteine direkt nachgewiesen werden. Dies ist von besonderer Relevanz, da durch den Einsatz von DNase in den Protokollen 2 und 3 der reine DNA-Gehalt nur eingeschränkt als Parameter zur

Evaluation einer effektiven Entfernung intrazellulärer Proteine herangezogen werden kann.

Als Zielproteine wurden das β -Aktin als Bestandteil des intrazellulären Zytoskeletts und das membranständige β_2 -Mikroglobulin auf Grund seiner bedeutenden Relevanz im Rahmen des Immunsystems ausgewählt [103].

Bei β_2 -Mikroglobulin blieb in beiden Gruppen eine Bandenbildung aus. Das Protein war somit nach der Dezellularisierung nicht mehr nachweisbar. Die Testung auf β -Aktin ergab in der Gruppe Protokoll 1 bei einer der drei Gruppen eine deutliche Bandenbildung, die zwei weiteren Proben zeigten eine deutlich geringere Ausprägung der Bandenbildung. In der Gruppe Protokoll 3 war keine Bandenbildung erkennbar (siehe Abb. 23).

Die Gruppe Protokoll 1 zeigte somit eine nicht vollständige Eliminierung intrazellulärer Proteine. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen der Ermittlung des DNA-Restgehaltes.

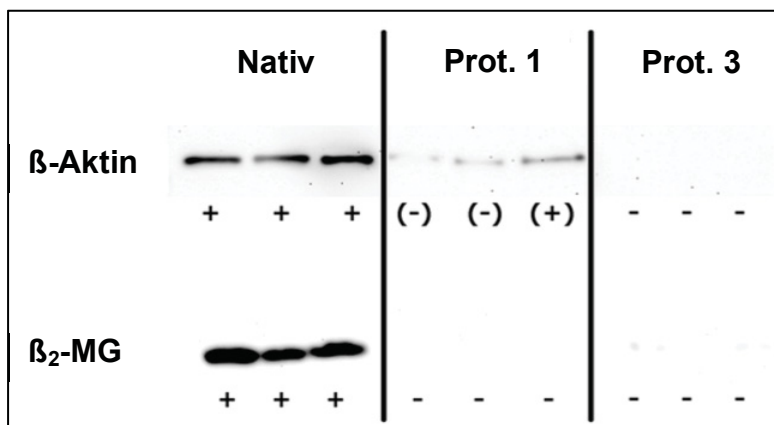


Abb. 23: Proteinanalyse über Western Blot. Gruppengröße n=3.

3.2 Studien an Aortenkonduits der Spezies Schwein.

3.2.1 Histologie und Immunhistologie

Die Gruppengröße für die histologische Auswertung wurde auf n=3 je Protokoll festgesetzt. Bei den histologischen Bildern handelt es sich um repräsentativ ausgesuchte Ausschnitte der Präparate in den jeweiligen Vergrößerungen. Es wurden jeweils die Klappenursprungsbereiche und mittige Anteile der Segel untersucht.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die nach Protokoll 1 und Protokoll 2 behandelten Proben waren in der HE-Färbung über sämtliche Regionen morphologisch frei von basophilen, zellkern-typischen Strukturen. Wie bereits bei der Proben der Spezies Ratte färbten sich auch bei den porcinen Proben die EZM der Gruppe Protokoll 1 im Vergleich zur Gruppe Protokoll 2 ubiquitär basophiler an.

Die grundsätzliche strukturelle Architektur der Aortenklappen war in beiden Gruppen erhalten. Die EZM der Gruppe Protokoll 1 stellte sich über weite Bereiche spongiös erweitert dar. Ferner zeigte sich das Kollagenfasernetz stellenweise deutliche wellenförmig konfiguriert. Abschnittsweise waren Defekte der EZM erkennbar. In der Gruppe Protokoll 2 zeigte sich die EZM deutlich dichter. Insbesondere das Gerüst der Fibrosa war kompakt erhalten. Auch hier waren abschnittsweise zirkuläre Defekte der EZM erkennbar. Verstärkt ausgeprägt war dies im Bereich der Spongiosa (siehe Abb. 24).

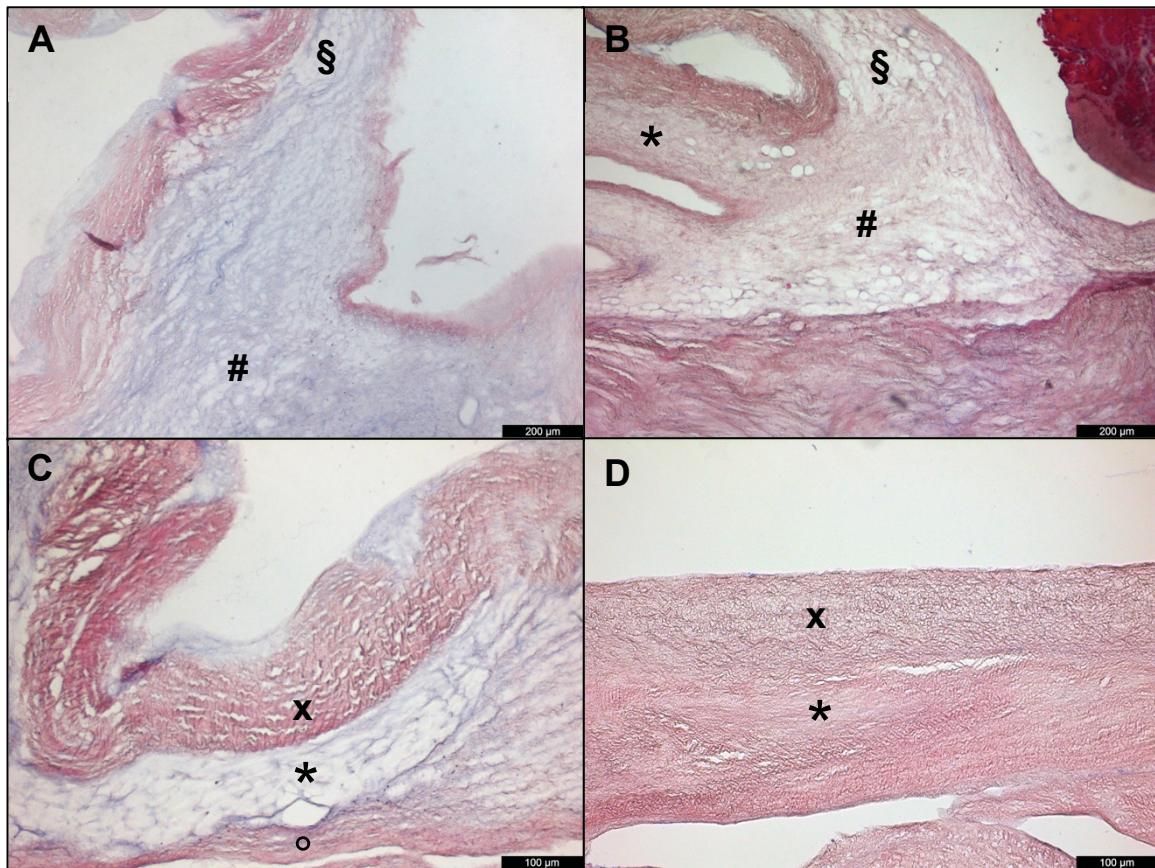


Abb. 24: Histologische Auswertung porciner Aortenklappen über die HE-Färbung. (A), (C) Protokoll 1; (B), (D) Protokoll 2. (A), (B) Bereich des Aortenklappenansatzes; (C), (D) Bereich des Aortenklappensegels. (§) Aortenklappensegel; (#) Aortenklappenansatz; (x) Lamina Fibrosa; (*) Lamina Spongiosa; (°) Lamina Ventrikularis. (A, B) 50x vergrößert (Maßstab 200 µm); (C, D) 100x vergrößert (Maßstab 100 µm). (C) und (D) mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Ltd. Lizenznummer: 4030950585627.

Movat-Pentachrom-Färbung

Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung mit der Movat-Pentachrom-Färbung hinsichtlich des Erhalts der Architektur waren konkordant zu denen der HE-Färbung. Auch hier konnte in beiden Gruppen eine weitgehende Azellularität festgestellt werden.

Wie bereits bei den Proben der Spezies Ratte nach Anwendung von Protokoll 3 beobachtet, kam es nach Durchlauf von Protokoll 2 zu einem deutlichen GAG-Verlust. Sowohl im Klappenursprungsbereich als auch im mittleren Bereich des Segels war kein Grünanteil bei der Färbung erkennbar. Die Gruppe Protokoll 1 hingegen zeigte einen deutlichen Grünanteil im Bereich der Spongiosa. Das

Kollagengerüst der Gruppe Protokoll 2 stellte sich im Vergleich zur Gruppe Protokoll 1 kompakter dar (siehe Abb. 25).

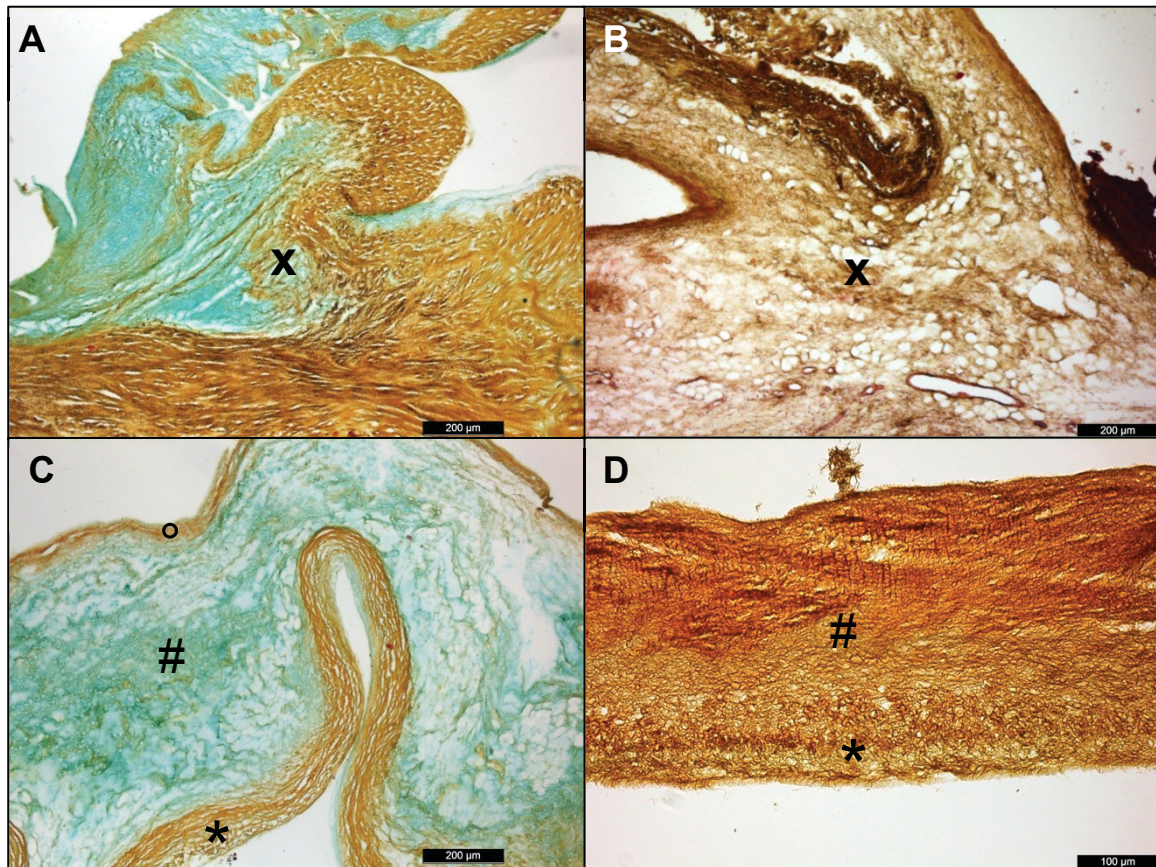


Abb. 25: Histologische Auswertung porciner Aortenklappen über die Movat-Pentachrom-Färbung. (A), (C) Protokoll 1; (B), (D) Protokoll 2. (A), (B) Bereich des Aortenklappenansatzes; (C), (D) Bereich des Aortenklappensegels. (#) Aortenklappenansatz; (x) Lamina Fibrosa; (*) Lamina Spongiosa; (°) Lamina Ventricularis. (A-C) 50x vergrößert (Maßstab 200 µm); (D) 100x vergrößert (Maßstab 100 µm). (A-D) mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Ltd. Lizenznummer: 4030950585627.

4',6-Diamidin-2-Phenylindol-Färbung

In der DAPI-Färbung zeigten sich in der Fluoreszenzmikroskopie deutlich fluoreszierende Signale bei den Aortenklappen der Gruppe Protokoll 1. Diese waren jedoch größtenteils nicht zellkernotypisch konfiguriert, was für eine Aufhebung der ursprünglichen Konfiguration der DNA spricht. Dies ist darüber hinaus eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit typischer Zellkernmorphologien in der HE- und Movat-Pentachrom-Färbung. Wahrscheinlich liegt auch hier die DNA in fragmentierter Form vor. Die Proben der Gruppe Protokoll 2 zeigte keine fluoreszierende Signale (siehe Abb. 26).

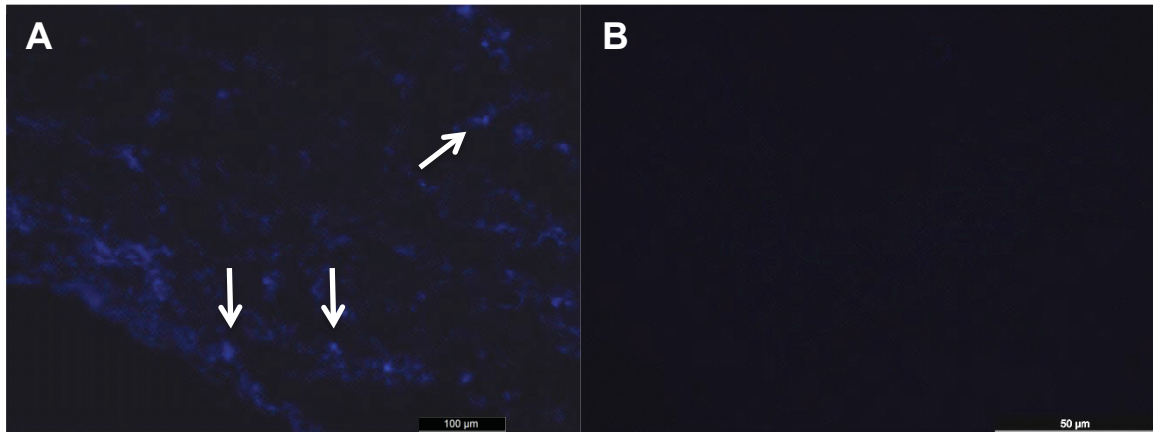
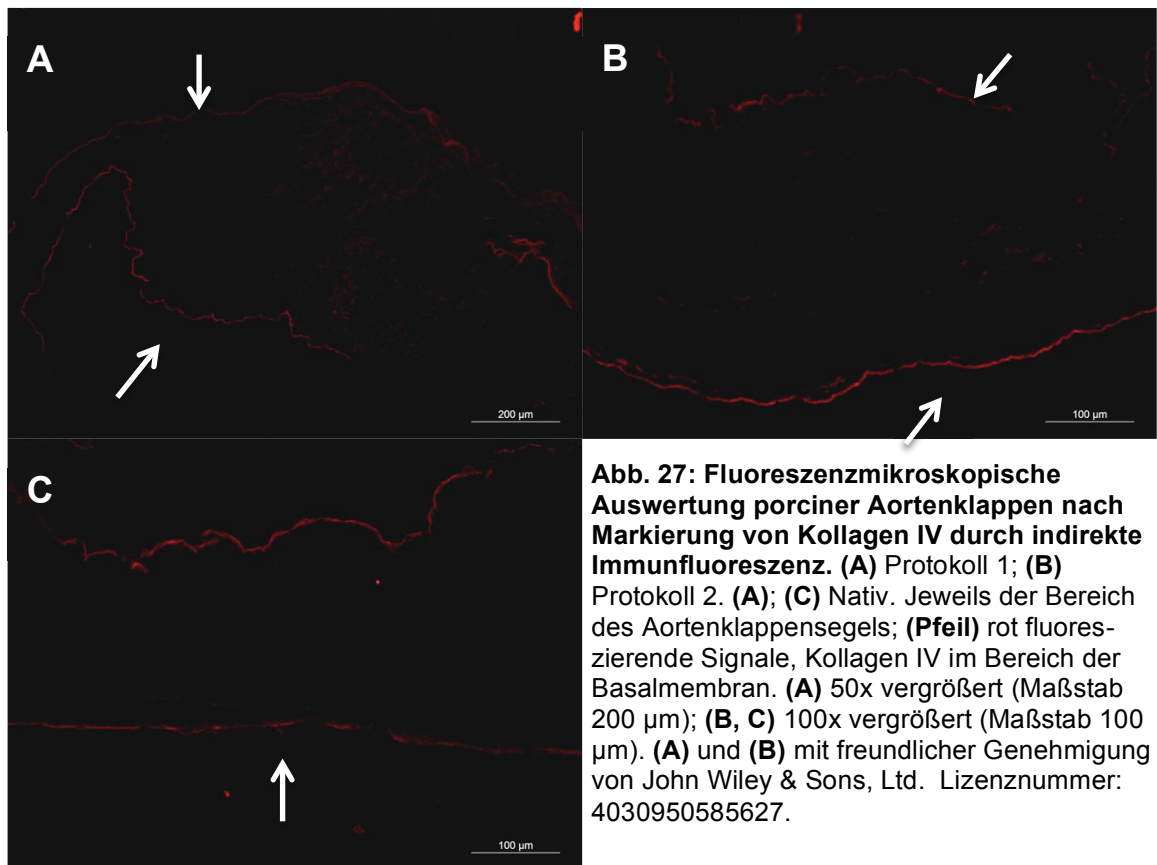


Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung porciner Aortenklappen über die DAPI-Färbung. (A) Protokoll 1; (B) Protokoll 2. (A), (B) Bereich des Aortenklappensegels; (Pfeil) blau fluoreszierende Signale. (B) zeigte keine Fluoreszenz auf. (A) 200x vergrößert (Maßstab 100 µm); (B) 400x vergrößert (Maßstab 50 µm).

Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung von Kollagen IV zeigte bei einem fast durchgehenden rot fluoreszierenden Signal im Bereich der Klappenoberfläche einen guten Erhalt der Basallamina in beiden Gruppen. Kleinere Unterbrechungen des Signales können durch Artefakte bedingt sein. Relevante Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren nicht zu erkennen (siehe Abb. 27).



3.2.2 Relativer Kollagengehalt

Für die einzelnen Versuchsgruppen wurde bei einer Gruppengröße von $n=3$ nachfolgende mittlere relative Kollagenanteile bestimmt. Der Mittelwert der Gruppe Nativ betrug 95,77%, der Mittelwert der Gruppe Protokoll 1 betrug 95,33 %, für die Gruppe Protokoll 3 wurde ein Mittelwert von 96,56% ermittelt. Eine statistische Auswertung ergab keine Signifikanz der Abweichungen zwischen den Gruppen.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen der histologischen Auswertung und ähnlichen Befunden im Studienarm der Spezies Ratte können die gefundenen Ergebnisse allenfalls als Trend gewertet werden. Mögliche Erklärungsansätze entsprechen denen der Spezies Ratte.

Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 28 dargestellt, die statistische Auswertung ist der Tabelle 7 zu entnehmen.

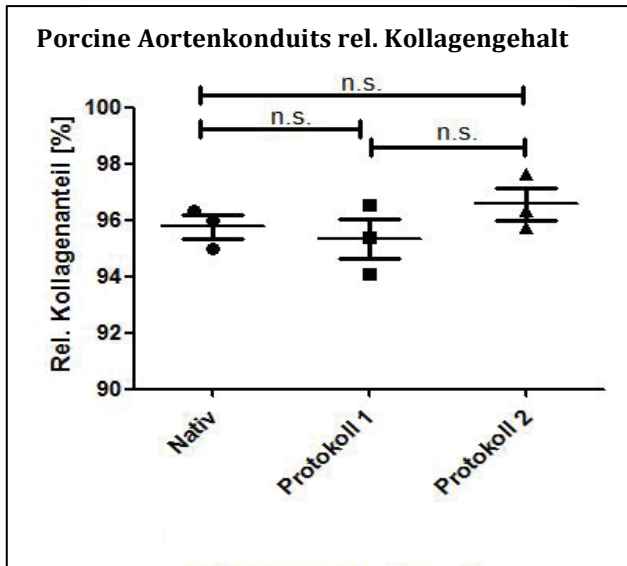


Abb. 28: Graphische Darstellung des relativen Kollagenanteils. Die Gruppengröße beträgt n=3; (n.s.) = „nicht signifikant“. Fehlerbalken +/- SEM; mittlerer Balken MV.

	Mittelwert [%]	Standardfehler [%]	Maximum [%]	Minimum [%]
Nativ	95,77	0,51	96,36	94,97
Prot. 1	95,33	0,87	96,55	94,08
Prot. 2	96,56	0,69	97,62	95,71

Tabelle 7: Relativer Kollagengehalt der porcinen Proben, Messwerte und statistische Auswertung.

3.2.3 Glykosaminoglykangehalt

Der in der histologischen Auswertung in der Gruppe Protokoll 2 vermutete GAG-Verlust konnte über die quantitative Bestimmung des GAG-Gehaltes bestätigt werden. Die Gruppe Protokoll 2 zeigte gegenüber der nativen Kontrollgruppe eine statistisch signifikante ($p < 0,001$) GAG-Reduktion von im Mittel 52,6% von 240,41 $\mu\text{g}/\text{mg}$ auf 113,84 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Zwischen der nativen Vergleichsgruppe und der Gruppe Protokoll 1 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. Dies gilt auch für den Vergleich zwischen den Gruppen Protokoll 1 und Protokoll 2. Es ist jedoch ein in der Tendenz geringerer GAG-Anteil in den Proben der Gruppe Protokoll 2 im Vergleich zu Protokoll 1 erkennbar (182,39 $\mu\text{g}/\text{g}$ Protokoll 1; 113,84 $\mu\text{g}/\text{g}$ Protokoll 2). Unterstützt wird dies durch die Resultate der histologischen Auswertung. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 29 dargestellt, die statistische Auswertung ist der Tabelle 8 zu entnehmen. Die ermittelten Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Spezies Ratte.

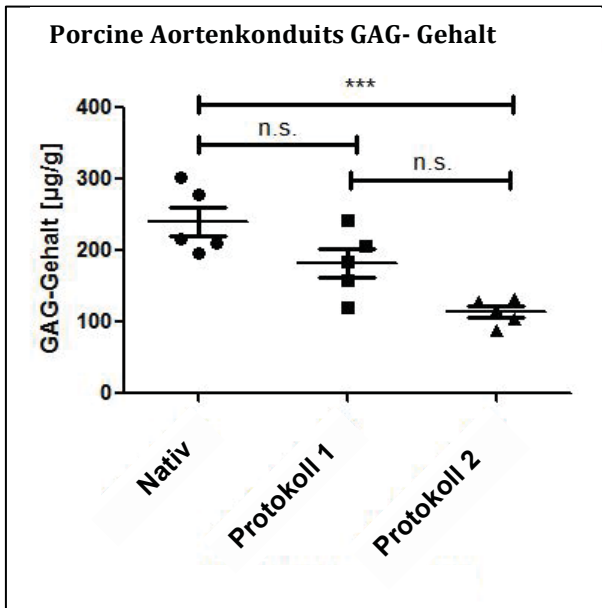


Abb. 29: Graphische Darstellung des GAG-Gehalts. Die Gruppengröße beträgt n=5; (***) steht für eine Signifikanz von $p < 0,001$; (n.s.) = „nicht signifikant“. Fehlerbalken +/- SEM; mittlerer Balken MV.

	Mittelwert [µg/g]	Standardfehler [µg/g]	Maximum [µg/g]	Minimum [µg/g]
Nativ	240,41	23,09	301,55	196,24
Prot. 1	182,39	23,39	242,98	119,73
Prot. 2	113,84	9,11	132,99	88,18

Tabelle 8: GAG- Gehalt der porcinen Proben, Messwerte und statistische Auswertung.

3.2.4 DNA-Konzentration

In der DAPI-Färbung waren in der Gruppe Protokoll 1 fluoreszierende Signale erkennbar, die Gruppe Protokoll 2 hingegen zeigte keine Signale. Die quantitative Ermittlung der DNA-Konzentration im Gewebe bestätigte dieses Ergebnis. Bei einer Gruppengröße von je $n=12$ betrug der mittlere DNA-Gehalt der Gruppe Protokoll 1 $0,174 \mu\text{g}/\text{mg}$ während in der Gruppe Protokoll 2 der Gehalt bei $0,019 \mu\text{g}/\text{mg}$ lag. Der gefundene Unterschied ist statistisch signifikant $p < 0,001$. Nach Durchlauf von Protokoll 2 war die DNA-Konzentration gegenüber den Nativpräparaten ($0,245 \mu\text{g}/\text{mg}$) im Mittel um über 92% reduziert.

Der Vergleich zwischen der nativen Kontrollgruppe und der Gruppe Protokoll 1 ergab eine Reduktion der DNA-Konzentration um 29%. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 30 dargestellt, die statistische Auswertung ist der Tabelle 9 zu entnehmen.

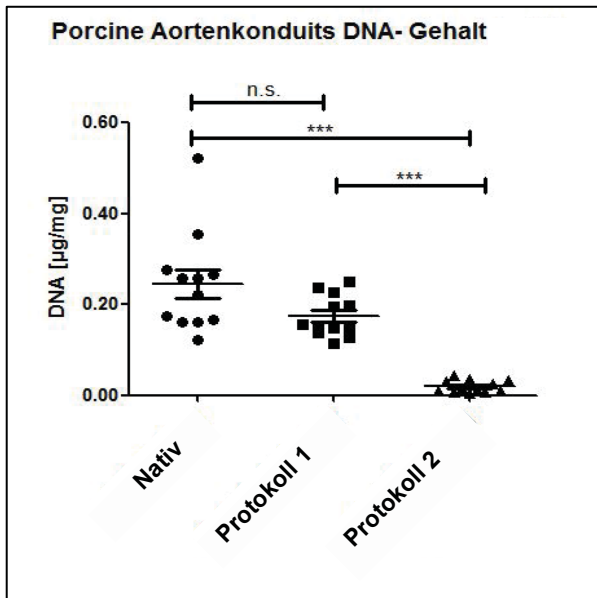


Abb. 30: Graphische Darstellung des DNA-Gehalts. Die Gruppengröße beträgt n=12; (***) entspricht $p < 0,001$; (n.s.) = „nicht signifikant“. Fehlerbalken +/- SEM; mittlerer Balken MV.

	Mittelwert [µg/mg]	Standardfehler [µg/mg]	Maximum [µg/mg]	Minimum [µg/mg]
Nativ	0,245	0,033	0,522	0,121
Prot. 1	0.174	0,014	0,237	0,114
Prot. 2	0,019	0,004	0,044	0,004

Tabelle 9: DNA-Gehalt der porcinen Proben, Messwerte und statistische Auswertung.

3.2.5 Proteinanalyse über Western Blot

Die Proteinanalyse auf die Zielproteine β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin über Western Blot zeigte im Vergleich zu den Ergebnissen der Spezies Ratte ein abweichendes Ergebnis.

In der Gruppe Protokoll 1 blieb eine Bandenbildung aus, beide Zielproteine waren nicht nachweisbar. Im Vergleich zu den Proben der Spezies Ratte zeigte sich eine wirksamere Eliminierung von β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin aus diesem Gewebe. In der Gruppe Protokoll 2 war in 1 von 5 Proben eine schwach positive Bande für β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin erkennbar. In 2 Proben für β_2 -Mikroglobulin waren unspezifische Banden zu erkennen (siehe Abb. 31).

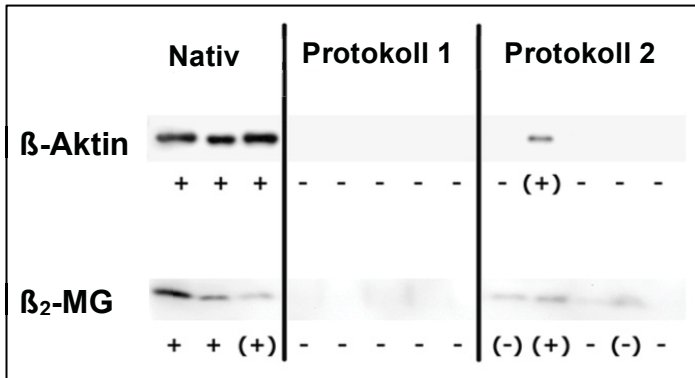


Abb. 31: Proteinanalyse über Western Blot. Gruppengröße n=3 nativ; n=5 Protokoll 1 und 2.

3.2.6 Zytotoxizitätstests

Der durchgeführte Zytotoxizitätstest diente dem Ausschluss stärkerer toxischer Effekte der eingesetzten Chemikalien auf die Zellproliferation und Zellvitalität. Dies ist eine Voraussetzung für einen Einsatz der entsprechenden Protokolle *in vivo*.

Die in den Gruppen Protokoll 2 und Protokoll 3 eingesetzten Substanzen unterschieden sich nicht. Die Verwendung porcinen Gewebes erlaubt den Einsatz von mehr Material für die zytotoxische Untersuchung. Die hierdurch erreichten höheren Konzentrationen von potentiell zytotoxischen Inhaltsstoffen bedingen eine Verbesserung der zytotoxischen Sensitivität im Vergleich zum Rattenmodell. Daher wurde für die Spezies Ratte auf diese Untersuchung verzichtet und analoge Ergebnisse für das Protokoll 3 unterstellt.

Ein toxischer Effekt konnte für beide Gruppen nicht festgestellt werden. Im Vergleich zur Nativ- und Kontrollgruppe zeigte sich weder in der Gruppe Protokoll 1 noch in der Gruppe Protokoll 2 ein negativer Einfluss auf die Zellproliferation. Die Zellvitalität betrug über 99%. In Abb. 32 sind repräsentative Aufnahmen der Zellkulturen abgebildet, die Abb. 33 stellt die Zellanzahl graphisch dar.

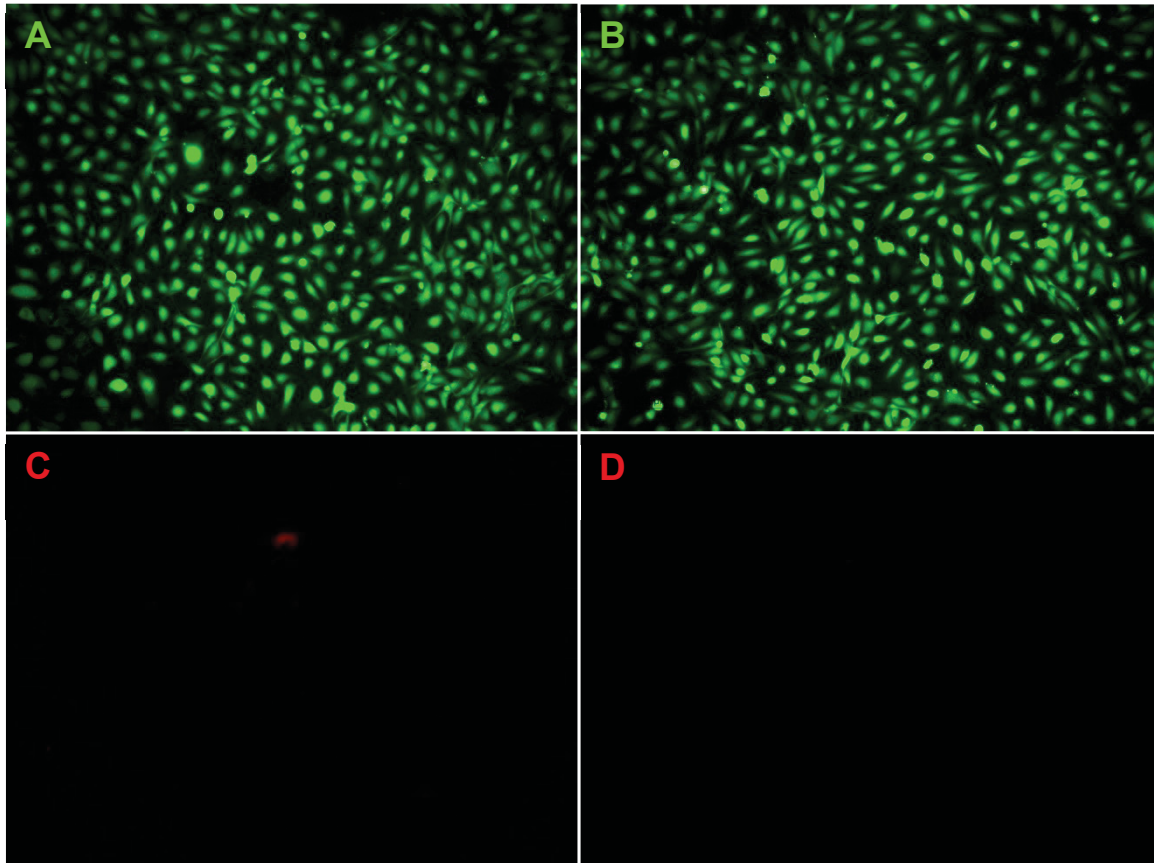


Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zytotoxizitätstests. Vitale Zellen grünfluoreszierend durch Calcein-AM; avitale Zellen rotfluoreszierend durch Ethidiumbromid. (A), (C) Protokoll 1; (B), (D) Protokoll 2. Jeweils mittige Aufnahmen der jeweiligen Löcher des Wells.

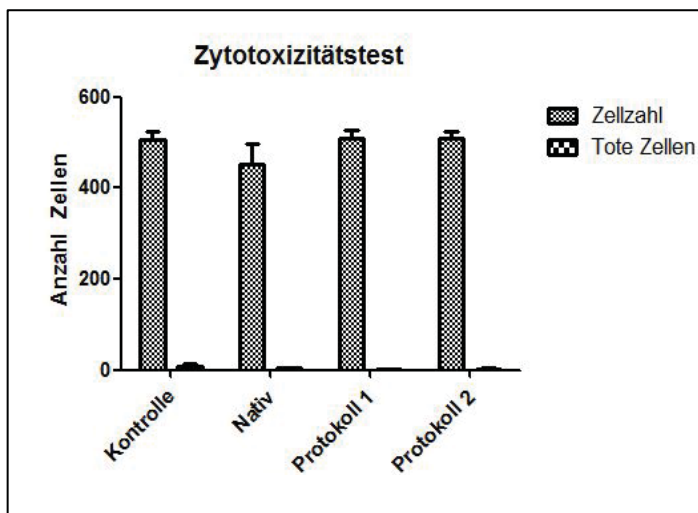


Abb. 33: Graphische Darstellung der Zellzahl nach Zytotoxizitätstest. Fehlerbalken SEM.

3.2.7 Rebesiedelungsversuche

Ziel der durchgeführten Rebesiedelungsversuche war es, *in vitro* die Charakteristika der Interaktion zwischen HUVECs und den nach den jeweiligen Protokollen dezellulierten Geweben zu analysieren.

Zum Zeitpunkt Tag 3 waren in beiden Versuchsgruppen an der Oberfläche der dezellularisierten Aortenklappen bei sagittaler Schnittführung einzelne Zellkörper zu erkennen. Eine Invasion der Zellen in die Matrix der Gerüste hinein hatte nicht stattgefunden. Wesentliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren nicht festzustellen.

Der Zeitpunkt Tag 7 zeigte ein analoges Bild. Auch hier war eine Zellinvasion nicht zu erkennen, die Dichte des Zellrasens auf der Oberfläche entsprach etwa der vom Zeitpunkt Tag 3. Es waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar. Repräsentative Aufnahmen der histologischen Auswertung sind Abb. 34 zu entnehmen.

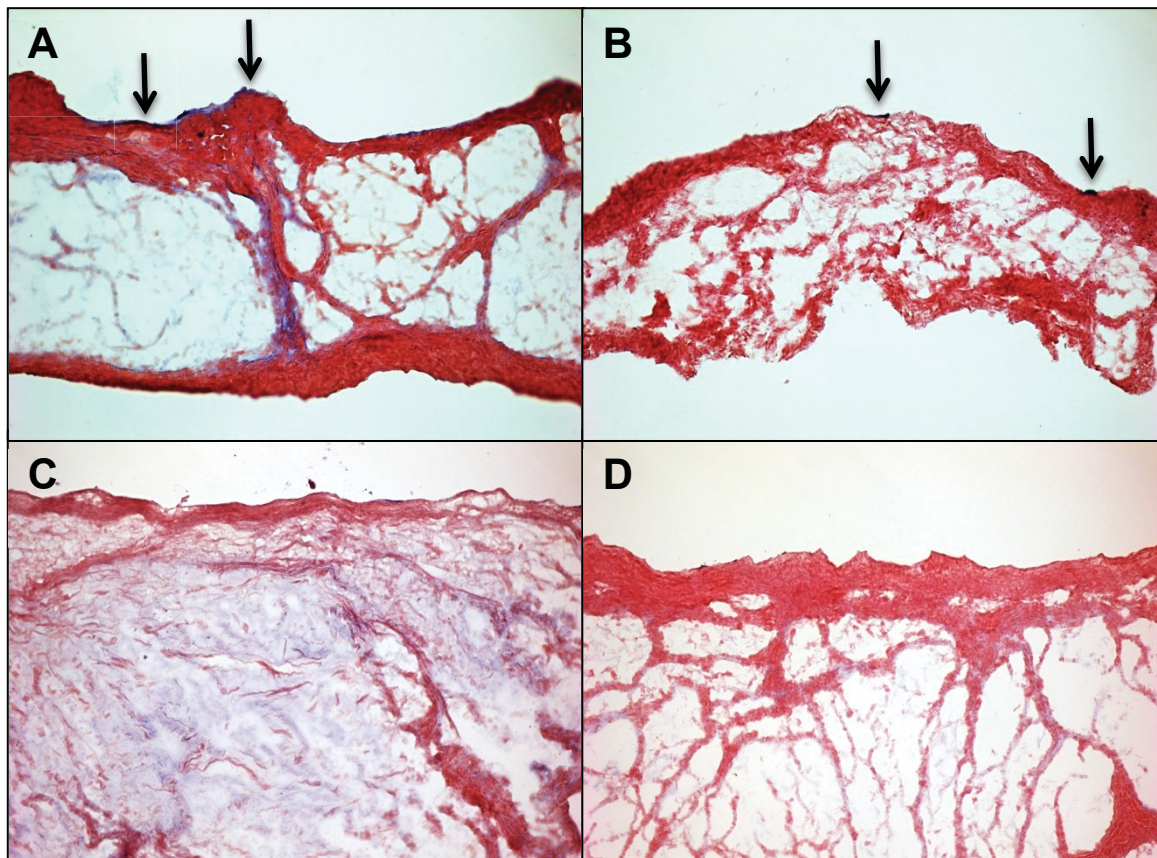


Abb. 34: Mikroskopische Aufnahme porciner Aortenklappen nach Rebesiedelung und HE-Färbung. Mit (Pfeil) markiert sind basophil angefärbte Zellleiber. (A), (C) Gruppe Protokoll 1; (B), (D) Gruppe Protokoll 2. (A), (B) Tag 3; (C), (D) Tag 7.

4. Diskussion

Dezellarisierungsverfahren auf Basis von Detergenzien und proteolytischen Substanzen finden aktuell eine breite Anwendung im Bereich des kardiovaskulären *Tissue Engineerings* [84, 93, 104-106]. Berichte über eine unzureichende Eliminierung von zellulären Proteinen [76], Bedenken hinsichtlich der Zytotoxizität der eingesetzten Substanzen, [74, 75] sowie Studien über ein vorzeitiges Versagen von TE Herzklappenprothesen in pädiatrischen Patienten, welche mit einer unzureichenden Dezellarisierung in Verbindung gebracht wurden, [62, 63] betonen die Notwendigkeit zur Erforschung alternativer Dezellarisierungsverfahren in diesem Anwendungsbereich.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die erstmalige *in vitro* Evaluation eines neuartigen Dezellarisierungsverfahrens für Anwendungen im Bereich des kardiovaskulären *Tissue Engineerings*, welches vollständig auf die Verwendung von Detergenzien und proteolytische Substanzen verzichtet.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch den Verzicht dieser Substanzen eine bessere Konservierung der EZM erreicht werden kann und die Eliminierung zellulärer Bestandteile effektiv über den Einsatz von DNase, Latrunculin B und hochmolaren Salzlösungen gelingt. Die Ergebnisse wurden mit Proben, die ein gut etabliertes, Detergenzien-basiertes Dezellarisierungsverfahren auf Basis von SDS, DCA und Natriumazid durchliefen, verglichen [52, 83, 84].

4.1 Diskussion der Methoden

Im Folgenden wird kurz auf die verwendeten Methoden zur Evaluation des Dezellarisierungserfolgs eingegangen, mögliche Limitationen diskutiert.

4.1.1 Wahl der Spenderspezies

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Evaluation der Versuchsprotokolle an Geweben der Spezies Ratte und Schwein.

Die Rattenspezies Sprague-Dawley wurde auf Grund der weiten Verfügbarkeit, den günstigen Haltungs- und Anschaffungskosten sowie der breiten Anwendung in der medizinischen Forschung gewählt. Die Rasse, das Alter und das Geschlecht

der Ratten wurden hierbei standardisiert, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erreichen und diese als mögliche Fehlerquellen auszuschalten.

Über diese Arbeit hinausgehend, eignen sich Sprague-Dawley Rattenaortenkonduits ferner für eine *in vivo* Evaluation der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfahren in einem Modell mit allogener Implantation von dezellularisierten Sprague-Dawley Aortenkonduits in Wistar Ratten [83].

Die Proben porcinen Ursprungs wurden von der Willy Siemes und Sohn GmbH & Co. KG in Viersen bezogen. Auf Grund der vorherrschenden technischen Abläufe während der Schlachtung war eine genaue Bestimmung des Alters der Tiere und des Geschlechts nicht möglich. Das Herzgewicht wurde daher als Maßstab verwendet. Zum Einsatz kamen Herzen mit einem Gewicht von 350 bis 500g.

Sofern möglich, ist eine genaue Standardisierung des Alters der porcinen Herzklappen sinnvoll. Unter anderen berichten Stephens, E.H., et al von einer Veränderung der histologischen Architektur und der mechanischen Eigenschaften abhängig vom Alter der porcinen Herzklappen. So wurde beispielsweise eine vermehrte Expression von Myofibroblasten in älteren Tieren beobachtet. Weiterhin wurde eine Vermehrung des Fibrosanteils der Herzklappen mit einer simultanen Zunahme des Kollagenanteils in Abhängigkeit vom Alter der Tiere beschrieben. Veränderungen in der Elastizität und Steifigkeit der Herzklappen traten ebenfalls auf. [107] In der vorliegenden Arbeit wurden die bezogenen Herzklappen daher zufällig auf die Experimentalgruppen verteilt, um etwaige strukturelle Unterschiede zu balancieren.

Auf Grund seiner Anatomie und Physiologie mit Ähnlichkeit zum Menschen eignet sich das Schwein als gutes Modell zur Erforschung von Herzklappenprothesen im Großtierversuch [86, 108, 109]. Als Ausgangsgewebe wurde daher die Klappenregion mitsamt den anliegenden Aortenanteilen gewählt, da eine *in toto* (Aortenklappen inklusive Aortenwurzel) Implantation dieser Region im Tierversuch denkbar ist. Die vorliegende Arbeit schafft somit die Grundlage für eine zukünftige weitere *in vivo* Evaluation im Großtiermodell.

4.1.2 Eingesetzte Dezellularisierungsprotokolle

Die technische Durchführung der Dezellularisierung erfolgte auf einem Schüttler bei 220 U/min. Die Proben der Spezies Ratte befanden sich hierbei in waagerechter Position in 50 ml Zentrifugenröhrchen. Die Proben der Spezies Schwein wurden in 250 ml Vierkant-Glasreaktionsgefäßen dezellularisiert.

Im Bereich des kardiovaskulären Tissue Engineering ist die Dezellularisierung auf einem Schüttler auf Grund guter Ergebnisse eine breit etablierte Technologie [52, 83, 84, 110, 111]. Durch das Schütteln wird der chemische Prozess der Dezellularisierung durch eine mechanische Komponente erweitert. Abhängig von der gewählten Schüttelgeschwindigkeit unterscheidet sich beispielweise der Rest-DNA Gehalt von porcinen Rückenmark nach Dezellularisierung um ein Vielfaches [111]. Durch die Schüttelbewegung wird außerdem eine gleichmäßige Verteilung der verwendeten Chemikalien erreicht. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der leichten und kostengünstigen Durchführbarkeit, da keine aufwendigen Gerätschaften benötigt werden.

Der Vorgang der Lösungswechsel birgt die Gefahr der Kontamination. Auch wurde während der Durchführung der Dezellularisierungen vereinzelt beobachtet, dass sich Rattenaortenkonduits derart ungünstig in den Flüssigkeitsstrom anordneten, dass eine effektive luminale Perfusion unwahrscheinlich erschien. Vor diesem Hintergrund ist der Einsatz einer mechanisch druckkontrollierten luminalen Perfusion denkbar. Montoya, C.V. et al konnten zeigen, dass es bei der Dezellularisierung von Umbilikalvenen bei Anwendung eines Perfusionsverfahrens unter Verwendung der gleichen Substanzen im Vergleich zum Schütteln zu einer effektiveren Entfernung von DNA und Phospholipiden kommt [112]. Ferner wird durch Anwendung derartiger Systeme ein höherer Standardisierungsgrad erreicht.

Ein weiterer denkbarer Optimierungsansatz ist die Verwendung offener Systeme mit einem kontinuierlichen Austausch der Reaktionslösungen und Reaktionsprodukte zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeiten gemäß dem Massenwirkungsgesetz.

Protokoll I

Im Protokoll 1 kamen die Substanzen SDS, DCA, Natriumazid sowie Penicillin/Streptomycin zum Einsatz. Die Gesamtdauer des Verfahrens betrug

168 h bei einer Gesamtanzahl von 8 Lösungswechseln. Bei SDS handelt es sich um ein Tensid welches eine breite Verwendung in molekularbiologischen Anwendungen findet. Konzentrationsabhängig kommt es unter anderem durch komplexe hydrophobe und ionische Wechselwirkungen sowie Mizellenbildung zu einer Entfaltung der tertiären Proteinstruktur und einer Denaturierung von Proteinen [113]. Auf mögliche toxische Eigenschaften wurde in 1.3 hingewiesen. DCA ist eine sekundäre Gallensäure, diese hat ebenfalls tensidische Eigenschaften. Neben anderen beschreiben von Bloch, O., et al. eine alleinige Anwendung von DCA als Weg zu einer erfolgreichen Dezellularisierung von porcinen Herzklappen. Von Bloch, O. berichtet hierbei von einer Gesamtproteinreduktion von 93% [114].

Der Einsatz von NaN_3 führt unter anderem über eine Inhibition der Cytochrom C-Oxidase zu einer Hemmung des Wachstums von Bakterien [115, 116]. Hierdurch kann einer Kontamination durch bakteriellen Befall entgegen gewirkt werden. Zu beachten ist jedoch die generelle Toxizität auf den Menschen und die Umwelt, weshalb ein effektives Auswaschen und eine adäquate Entsorgung gewährleistet werden müssen. Der Einsatz von Penicillin/Streptomycin diene ebenfalls der Vermeidung bakterieller Kontaminationen.

Protokoll II

Die Gesamtlänge von Protokoll 1 betrug 144 h bei insgesamt 22 erfolgten Lösungswechseln. Als Substrate für die Dezellularisierung wurden Latrunculin B, 0,6 M Kaliumchlorid, 1 M Kaliumiodid, 1 kU/ml DNase I in PBS und Aqua bidest. eingesetzt. Die Wirkweise von Latrunculin B wurde in 1.3 beschrieben. Kaliumchlorid und Kaliumiodid wirken über zwei Mechanismen. Zum einen kommt es durch die verwendeten hochmolaren Lösungen zu einer osmotisch bedingten Lyse der Zellen, zum anderen bedingen diese chaotropen Substanzen eine Zunahme der Löslichkeit und Denaturierung von Proteinen [117, 118]. Aqua bidest. diene dem Auswaschen der verwendeten Substanzen und des Detritus. Außerdem kommt es auch hier osmotisch bedingt zur Zelllyse.

Das Enzym DNase I kommt vielfach im Bereich des TE zur Anwendung [111].

Protokoll III

Im Protokoll III kamen die gleichen Substanzen wie in Protokoll II zum Einsatz. Die Gesamtdauer des Verfahrens betrug 168 h bei insgesamt 41 Lösungswechseln. Die hohe Anzahl der Lösungswechsel geht mit einem erhöhten personellen Arbeitsaufwand einher. Gleichzeitig bedingt die hohe Frequenz der Lösungswechsel ein erhöhtes Kontaminierungsrisiko. Auch ist der materielle Aufwand erhöht. Insgesamt stellt das Protokoll III eine neuartige gewebe-spezifische Optimierung ausgehend von Protokoll II dar.

Protokollfindung

Der Auswahl von Protokoll 3 als Vergleichsprotokoll für den Studienarm der Spezies Ratte gingen umfangreiche Versuchsreihen zur Protokolloptimierung voraus. Hierbei wurden zwei Konzepte verfolgt. Zum einen Variationen im Ablauf von Protokoll 2 und zum anderen die Kombination von Protokoll 2 mit den Detergenzien SDS, DCA und Triton X-100. Die Substanz Triton X-100 wurde eingesetzt, da diese vielfach im Rahmen des kardiovaskulären TE verwendet wird [104, 119]. Die Anwendung von Protokoll 2 hatte zuvor gezeigt, dass sich dieses Verfahren prinzipiell für die Anwendung zur Dezellularisierung von Aortenkonduits der Ratte eignet. Zwar verblieben Zellreste im Bereich der Media der Aortenwand und an den Ansätzen der Aortenklappen, die adventitia- und intimanahen Anteile zeichneten sich jedoch durch Azellularität bei sehr gutem Erhalt der EZM aus. Die unzureichende Eliminierung sämtlicher zellulärer Bestandteile beruhte folglich am ehesten auf einer unzureichenden Einwirkung der Substanzen auf die entsprechenden Bereiche, so dass eine Intensivierung der Einwirkungszeit und-frequenz der einzelnen Komponenten im Rahmen des Protokolls 3 schließlich das beste Ergebnis erzielen konnte.

Die Optimierung von Protokoll 2 erfolgte im Rahmen der Protokollvarianten 3, 4, 5 und 11. In den Protokollen 6 bis 10 wurden zusätzlich Detergenzien eingesetzt. Die Protokollvariante 3 war den anderen in der histologischen Auswertung deutlich überlegen.

4.1.3 Methoden zur Evaluation des Dezellularisierungserfolgs

Die Evaluation des Dezellularisierungserfolgs erfolgte in 3 Schritten. Im ersten Schritt wurde unter Zuhilfenahme histologischer Techniken eine orientierende

Analyse des Strukturerhalts und der erzielter Azellularität durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Objektivierung und Quantifizierung der beobachteten Ergebnisse unter Anwendung molekularbiologischer Techniken. Zuletzt erfolgte die Evaluation der Interaktion zwischen den generierten Prothesen und HUVECs in Hinblick auf Zytotoxizität und das Rebesiedelungsvermögen.

Histologische Auswertung

Die initiale Beurteilung des Erhalts der EZM und des Grades der Dezellularisierung erfolgte über die histologische Auswertung.

Die Rattenaortenkonduits wurden in 3 Regionen A-C unterteilt (siehe 2.2.1). Dies ermöglichte die separate Analyse der einzelnen Abschnitte der Aortenkonduits und ließ somit Rückschlüsse auf potentielle Schwächen der Protokolle etwa auf Grund einer unzureichenden Perfusion zu. Dies wurde jedoch nicht beobachtet.

Für die histologische Auswertung der procinen Aortenkonduits wurde von jedem Tier jeweils eine der drei Aortenklappen verwendet.

Von jeder Region wurde gemäß einem standardisierten Schneideprotokoll eine Vielzahl histologischer Schnitte erzeugt und analysiert. Für die Abbildungen wurden jeweils die repräsentativen Bilder ausgewählt.

Die HE-Färbung ermöglicht die Detektion und Lokalisation von Zellkernen und Zytoplasmaanteilen welche reich an rauem endoplasmatischem Retikulum sind. Andere Bestandteile des Zytoplasmas und der EZM werden unspezifisch durch den Farbstoff Eosin gegengefärbt [82]. Eine detaillierte Analyse der Bestandteile der EZM war somit nicht möglich. Es ließen sich aber orientierende Aussagen zur Integrität der EZM treffen. In Kombination mit der DAPI-Färbung war es möglich, DNA-Bestandteile sicher zu identifizieren und Bereichen im Gewebe zuzuordnen. Die Movat-Pentachrom-Färbung ermöglicht durch Anfärben einzelner Bestandteile [87] eine detaillierter Untersuchung der EZM und wird in der Literatur vielfach zur histologischen Analyse dieser verwendet [58, 119-121].

Kollagen IV ist ein wichtiger Bestandteil der endothelialen Basalmembran und wird häufig als ein Parameter für den Erhalt der Basalmembran herangezogen [122-124]. Darüber hinaus ist Kollagen IV wichtig für integrinvermittelte Interaktion zwischen Zellen [125]. Die selektive morphologische Darstellung besitzt einen

hohen Stellenwert, da es durch die Dezellularisierung zu einer Verschleppung von Proteinanteilen im Gewebe kommen kann.

Molekularbiologische Untersuchung

Nach der qualitativen Darstellung von Kollagen IV ließ die Bestimmung des relativen Gesamtkollagenanteils weitere Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Proben und deren Veränderung in Abhängigkeit vom durchlaufenen Versuchsprotokoll zu. Die quantitative Darstellung ermöglichte einen Vergleich zwischen den Versuchsgruppen.

Wie unter 1.2 dargelegt, kommen Glykosaminoglykane in der Spongiosa von Herzklappen vermehrt vor, sie sind somit ein wichtiger Bestandteil. Hyaluronsäure und Dermatansulfat machen hierbei etwa 90% aller GAGs der Herzklappen aus [126]. GAGs sind mit Ausnahme der Hyaluronsäure kovalent an Proteine gebunden und als Proteoglykane unterschiedlicher Größe mit dem Kollagennetz assoziiert [127]. Insbesondere die hydrophile Hyaluronsäure bindet Wassermoleküle. Sie spielt eine bedeutende Rolle für die Dicke der Herzklappen und die Absorption einwirkender Kräfte während der Herzaktion [128]. Ferner interagieren GAGs mit einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen und haben somit mannigfaltige Bedeutung etwa in der Vermittlung von Inflammation [129]. Über die Movat-Pentachrom-Färbung erfolgte die qualitative Darstellung der GAGs. Auf Grund ihrer großen Bedeutung erfolgte im Anschluss die quantitative Bestimmung über den *Blyscan Glycosaminoglycan Assay*. Dieser ermöglichte den objektiven Vergleich zwischen den Versuchsgruppen.

Die Quantifizierung des DNA-Gehalts wird vielfach als Maß für den Grad der Azellularität herangezogen [65, 92-94]. Crapo P. M. et al. halten einen DNA-Gehalt von <50 ng dsDNA/mg Gewebe (Trockengewicht) nach Dezellularisierung für erforderlich [111]. Es wird vermutet, dass DNA-Reste Inflammationsreaktionen bedingen können. So führt etwa die unzureichende Entfernung der DNA abgestorbener Zellen zur Aktivierung des unspezifischen Immunsystems [130]. Das verwendete Verfahren zur Quantifizierung des DNA-Gehalts bestimmte den DNA-Gehalt pro mg Gewebe. Darüberhinaus gehend ist eine Längenbestimmung der Rest-DNA sinnvoll. Gilbert, T.W. et al gehen beispielsweise davon aus, dass DNA-Fragmente mit einer Länge kleiner 300 Basenpaaren keine wesentlichen negativen Auswirkungen auf die Reorganisation des Gewebes haben [131].

Wie in 4.1.5 beschrieben, schränkt der Einsatz von DNase die Verwendung des DNA-Gehalts als Parameter für die Bestimmung der zellulären Bestandteile in den Proben ein. Der Nachweis dieser zellulären Bestandteile erfolgte daher über die Detektion von β -Aktin und β 2-Mikroglobulin mittels *Western Blot*. Das β -Aktin ist ein Teil des intrazellulären Zytoskeletts [132], das membranständige β ₂-Mikroglobulin eignet sich in besonderer Weise auf Grund seiner Bedeutung für das Immunsystem [103].

Zellkulturstudien

Mit Hilfe der Zellkulturstudien wurden die Eigenschaften der generierten Prothesen in Hinblick auf eine potentielle Zytotoxizität der eingesetzten Substanzen und das Rebesiedelungsvermögen untersucht.

Der verwendete Zytotoxizitätstest wurde in Anlehnung an ein von Akhyari, P. et al. genutzten Assay konzipiert [92]. Er erlaubt die Detektion von Effekten auf die Zellproliferation und die Zellvitalität. Mögliche Langzeiteffekte werden jedoch nicht erfasst. Die Verwendung von HUVEC ist im Bereich des *Tissue Engineerings* gut etabliert [40, 45, 53].

Die Rebesiedelungsstudien hatten auf Grund der geringen Gruppengröße (n=2 je Zeitpunkt) orientierenden Charakter. Die histologische Auswertung beschränkte sich hier auf die Präsenz und die Lokalisation der Zellen. Die Auswertungszeitpunkte nach 3 und nach 7 Tagen dienten der Evaluation im Hinblick auf das Adhäsionsverhalten an die Oberfläche der Gerüste (Tag 3) und eines möglichen Invasionsverhaltens in die Matrix hinein (Tag 7).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Der Dezellularisierungserfolg wurde durch drei verschiedene Aspekte bewertet: Die erreichte Azellularität, den Erhalt der EZM und die Zytokompatibilität. Dabei wurden speziesabhängige Unterschiede berücksichtigt.

4.2.1 Azellularität

Die Proben der Spezies Ratte erreichten in der histologischen Auswertung der Protokolle 1 und 3 eine morphologische Azellularität. Auch bei der Spezies Schwein wurde diese durch die Protokolle 1 und 2 erreicht. Der gezielte Nachweis

von DNA mit Hilfe der DAPI-Färbung und die molekularbiologische Quantifizierung der DNA-Konzentration zeigte einen höheren Gehalt an DNA in den Proben der Gruppe Protokoll 1 im Vergleich zu den Proben der Gruppen Protokoll 2 und 3. Für die Gruppen Protokoll 2 und 3 wurden hierbei jeweils Werte unterhalb der von Crapo P. M. et al. geforderten <50 ng dsDNA/mg Gewebe gefunden.

In den Gruppen Protokoll 2 und 3 kam DNase zum Einsatz, in der Gruppe Protokoll 1 war dies nicht der Fall. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Die Ergebnisse aus der Anwendung von Protokoll 2 auf die Aortenkonduits der Ratte und den Versuchsreihen zur Etablierung von Protokoll 3 zeigten jedoch, dass neben der Verwendung von DNase auch weitere Faktoren von Bedeutung sind. In der DAPI-Färbung hatten sich trotz der Verwendung von DNase deutliche DNA-Residuen im Bereich der Media der Aortenwand sowie an den Herzklappenansätzen gezeigt. Offensichtlich ermöglicht erst eine vorherige effektive Zelllyse den effizienten Einsatz der DNase.

Die Verwendung von DNase birgt jedoch auch Risiken. Die DNase ist häufig bovinen Ursprungs und kann daher potenziell Immunreaktion gegen im Gewebe verbleibende DNase-Reste provozieren [133]. Weiterhin kann die DNase Alterationen an der EZM verursachen. Daher besitzt die effektive Auswaschung der DNase einen hohen Stellenwert.

In vivo ist der Einfluss verbleibender DNA-Reste nicht abschließend geklärt. Während einige Autoren geringe DNA-Mengen mit einer niedrigen Anzahl von Basenpaaren für unbedenklich halten (siehe 4.1.3 und [127]), kam es bei einer Studie an porcinen Aortenkonduits in Bereichen mit DNA-Residuen vermehrt zu Kalzifikation [110]. Auch das gehäufte Versagen kommerzieller TE Herzklappenprothesen wird mit einem hohen Rest-DNA Gehalt vor Implantation in Verbindung gebracht [63].

Der DNA-Gehalt wird vielfach als Maß für die Zellfreiheit verwendet [92, 106, 110]. Dies ist jedoch eine starke Vereinfachung. So beeinträchtigt beispielsweise der Einsatz der DNase die Aussagekraft des DNA-Gehalts als Messwert für die Azellularität. Trotz nicht mehr nachweisbarer DNA können zelluläre Proteine im Gewebe persistent sein. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Azellularität

zusätzlich über die Bestimmung von β -Aktin und β_2 -Mikroglobulin mittels *Western Blot* verifiziert.

Das in den Protokollen eingesetzte Latrunculin B ist für seine Aktin zerstörenden Eigenschaften bekannt. Die Ergebnisse zeigten eine effektive Eliminierung von β -Aktin bei Anwendung der Protokolle 2 und 3. Dies untermauert den Einsatz von Latrunculin B im Bereich des kardiovaskulären TE.

Eine der 5 porcinen Proben, welche Protokoll 2 durchliefen, zeigte sowohl β -Aktin- als auch β_2 -Mikroglobulin- Banden. Da sich diese Beobachtung in keiner der anderen Prothesen wiederholte, wird sie auf einen fehlerhaften Dezellularisierungsdurchgang zurückgeführt und daher nachfolgend nicht weiter diskutiert.

Speziesabhängige Unterschiede wurden in den Gruppen Protokoll 1 beobachtet. Während in den porcinen Aortenklappen kein β -Aktin nachgewiesen werden konnte, wurden in den Aortenkonduits der Ratte β -Aktin- Rückstände detektiert. Der kompaktere Aufbau der Aortenwand bei der Ratte könnte hierfür die Ursache sein. Dies verdeutlicht, dass eine Anpassung der Dezellularisierungsverfahren und Techniken an das Ausgangsgewebe unerlässlich ist [134].

Das membranständige β_2 -Mikroglobulin wurde von sämtlichen Protokollen effektiv entfernt. Dieses Ergebnis deckt sich für die Gruppen Protokoll 1 unter anderen mit Beobachtungen U. von Boer, et al. welche nach Anwendung eines ähnlichen auf SDS und DCA basierten Verfahrens an equinen Karotisgefäßen eine Reduktion des MHC-1 Komplexes um 97,8% feststellten [135].

Immunologische Aspekte

Interessanterweise provozierte die Injektion von Bestandteilen der von U. von Boer, et al generierten Prothesen in eine Maus- Spezies die Bildung von Antikörpern gegen Bestandteile dieser Prothesen [135].

H. Baraki, et al. konnten hingegen zeigen, dass die *in vivo* Implantation von mit SDS und DCA dezellularisierten ovinen Aortenkonduits in Form eines *Homografts* nach 3 und 9 Monaten in der histologischen Auswertung keine Hinweise auf bedeutende Abstoßungsreaktionen ergaben [85].

Die immunologische Reaktion, welche nach Protokoll 2 dezellularisierte xenotransplantierte Larynxmuskulatur hervorruft, wurde von J.M. Fishman, et al.

untersucht. Die immunologische Antwort des Empfängers veränderte sich in Richtung einer antiinflammatorischen TH2- Antwort mit Induktion einer M2-Differenzierung von Makrophagen [79].

Die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur hinsichtlich der induzierten Immunantwort zeigen den Bedarf einer Identifizierung zuverlässiger Marker für die Immunreaktion gegen dezellularisierte Gewebe [65].

Das α -Gal-Epitop konnte beispielsweise als ein entscheidendes Hindernis für den Erfolg von Xenotransplantationen identifiziert werden [136, 137]. Versuche mit *knock-out* α -Gal- Schweinspezies zeigten, dass nach Xenotransplantation von Herzen in Paviane eine hyperakute Abstoßungsreaktion ausblieb und die Überlebenszeit der Paviane von 2 auf 6 Monate verlängert werden konnte [138]. Da das α -Gal-Epitop auch bei Herzklappenprothesen eine wichtige Rolle spielt [139], ist die Bestimmung des α -Gal-Epitops bei auf dieser Arbeit aufbauenden Studien sinnvoll. Neben der in vitro-Bestimmung von Markern für zu erwartende Immunantwort erscheint die in vivo-Detektion verschiedener inflammatorischer Zytokine, wie z.B. Interleukin-1-beta, Interleukin-6, TNF-alpha oder TGF-beta, nach Implantation sinnvoll, um auch geringe inflammatorische Reaktionen auf das Implantat messen zu können.

4.2.2 Erhalt der extrazellulären Matrix

Die Evaluation der EZM erfolgte über histologische und molekularbiologische Techniken. Die Movat-Pentachrom-Färbung ermöglichte es, einzelne Bestandteile der EZM qualitativ darzustellen und Aussagen über die Zusammensetzung und den strukturellen Aufbau der generierten Prothesen zu treffen. In allen Versuchsgruppen beider Spezies blieb hierbei nach Durchlaufen der entsprechenden Dezellularisierungsverfahren die Architektur der EZM gut erhalten. Die in der Literatur beschriebene ausgeprägte Fragmentierung von Kollagen durch den Einsatz von SDS [73] konnte nicht beobachtet werden.

Die histologischen Auswertungen zeigten erstmals, dass die detergenzienfreien Dezellularisierungsverfahren (Protokoll 2 und 3) bei der Anwendung auf kardiovaskuläre Gewebe die EZM zu einem sehr hohen Grad erhalten. Aufbauend auf diese Arbeit bieten sich elektronenmikroskopische Untersuchungen für eine vertiefende Erforschung der Ultrastruktur der generierten Prothesen an.

Die immunhistologische Darstellung von Kollagen IV zeigte den Erhalt der Basalmembran in allen behandelten Proben des Schweins und der Ratte. Für das detergenten- basierte Verfahren entspricht dies den Beobachtungen anderer Gruppen [45, 106]. Für die Protokolle 2 und 3 war dies zuvor nicht beschrieben worden.

Bei allen Interventionsgruppen zeigte sich in der Movat-Pentachrom-Färbung ein geringerer Grünanteil im Vergleich zur nativen Kontrollgruppe. Dies war bei den Proben der Protokolle 2 und 3 im Vergleich zu den Proben von Protokoll 1 besonders ausgeprägt. Mit Hilfe von molekularbiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der geringe Grünanteil auf einen Verlust von GAG zurückzuführen ist.

Der geringere GAG-Gehalt ist darüber hinaus eine mögliche Erklärung für den höheren Kollagenanteil am Gesamtprotein der Proben Gruppe Protokoll 3 im Vergleich zur Gruppe Protokoll 1.

Die Bedeutung des GAG-Gehalts für das *in vivo* Schicksal der produzierten Prothesen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So zeigte etwa die Analyse degenerierter glutaraldehyd-fixierter biologischer Klappenprothesen eine massive Reduktion des GAG-Gehaltes um 93% im Vergleich zum Zustand unmittelbar nach der Fixierung [126]. Der reduzierte GAG-Gehalt wird als eine mögliche Ursache für das vorzeitige Prothesenversagen vermutet, wobei die GAG-Reduktion auch umgekehrt die Folge degenerativer Prozesse sein könnte [126, 140]. Auch führte der geringere GAG-Gehalt in diesen Klappen zu einer vermehrten Einstülpung der Segel [141]. Für die mechanischen Eigenschaften der Herzklappen sind GAG vor allem bei der Abfederung einwirkender mechanischer Kräfte von Bedeutung. Auf die Zugfestigkeit und Elastizität im Hochdruckbereich scheinen sie dagegen einen untergeordneten Einfluss zu haben [142]. Auch ihre Rolle im Rahmen von Kalzifikationsprozessen ist nicht abschließend geklärt. In älteren Studien wird von einem Zusammenhang zwischen Kalzifikation und dem GAG-Gehalt bei glutaraldehyd-fixierten Klappenprothesen ausgegangen [143]. Eine neuere Studie von Lovekamp, J.J., et al. zeigte, dass die Bedeutung der GAG für diesen Aspekt eher gering zu sein scheint [128]. Die Ergebnisse von glutaraldehyd-fixierten Herzklappenprothesen sind jedoch nur eingeschränkt auf *tissue engineerete* Prothesen übertragbar. Hier sind genauere Untersuchungen zur

Relevanz der GAG *in vivo* notwendig. Denkbar ist beispielsweise, dass ein geringerer Gehalt an GAG die Permeabilität des Gewebes für Zellen begünstigt und dies für das Rebesiedelungsverhalten *in vivo* vorteilhaft ist. Diese These unterstützt eine Arbeit von Assmann, A., et al.. Hier konnte in einem *in vivo* Rattenmodell eine schnellere Rebesiedlung von GAG- armen Prothesen im Vergleich zu GAG- reichen Prothesen gesehen werden. [144] Es ist denkbar, dass es im Verlauf nach erfolgter Rebesiedlung durch GAG Produktion der angesiedelten Zellen zu einem deutlichen Anstieg des GAG- Gehalts der Prothesen kommt.

Erkenntnisse aus der Etablierungsphase von Protokoll 3

Die Versuche zur Protokollfindung brachten wichtige Erkenntnisse. Die Dauer, Frequenz und die zeitliche Abfolge der Reaktionsschritte haben einen großen Einfluss auf den Grad der Azellularität und den Erhalt der EZM.

Die Ergebnisse der Versuchsreihen 4 bis 11 verdeutlichten dies anschaulich. So führte in den Versuchsprotokollen 6 bis 9 die Verwendung von SDS und DCA an Tag 1 bzw. zu Beginn von Tag 2 lediglich zu geringfügigen Beschädigungen der EZM. Wurden diese Stoffe hingegen im letzten Reaktionsschritt von Tag 2 eingesetzt, trat eine massive Destruktion der EZM mit Aufhebung des charakteristischen Aufbaus auf.

Die Versuchsprotokolle 4, 5 und 11 erreichten keine Azellularität. Bei Einsatz der gleichen Substanzen führte erst eine deutlich verlängerte Expositionszeit und der häufigere Wechseln der Reaktionslösungen im Rahmen von Protokoll 3 zu einer azellulären Matrix. Darüberhinaus zeigten die Ergebnisse des Versuchsprotokolls 5, dass durch eine verlängerte Einwirkzeit von DNase II eine verbesserte Fraktionierung der DNA erreicht werden kann.

4.2.3 Zytokompatibilität

Die möglichst schnelle autologe Rebesiedlung nach Implantation ist ein wichtiges Ziel bei der Verwendung *tissue engineerter* Prothesen, sofern auf eine vorherige Rebesiedlung *in vitro* verzichtet wurde [52, 83]. Die Abwesenheit eines intakten Endothels bedingt eine erhöhte Thrombogenität und kann ursächlich für Inflammationsprozesse sein [53, 145].

Mögliche zytotoxische Eigenschaften der verwendeten Substanzen stehen der Rebesiedelung potentiell im Wege. In der vorliegende Studie ergaben sich keine Anhaltspunkte für derartige Effekte. Die Spülschritte in Protokoll 1 scheinen ausreichend zu sein, es wurden keine Auswirkungen von SDS auf die Zellvitalität entsprechend den Beobachtungen anderer Studien beobachtet [75]. Mit dem verwendeten Versuchsaufbau sind jedoch keine Aussagen über mögliche *in vivo* Langzeiteffekte beispielsweise von Latrunculin B zu treffen.

Gratzer, P.F. et al. weisen daraufhin, dass nicht die verbleibenden SDS-Reste im Gewebe ursächlich für zytotoxische Effekte sein könnten, sondern die Alterationen der Matrixstruktur selber [146].

Die Rebesiedelungsversuche zeigten keine Unterschiede zwischen den angewandten Verfahren im Hinblick auf das Adhäsions- und Invasionsverhalten der Zellen *in vitro*. Hieraus lässt sich keine Priorisierung der Protokolle ableiten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die vorgenommenen Experimente keine Hinweise auf mögliche Zytotoxizität der bioartifiziellen Prothesen ergaben, sodass eine weitergehende *in vivo*-Evaluation gerechtfertigt und verantwortbar erscheint.

4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ohne den Einsatz von Detergenzien und proteolytischen Substanzen ein neuartiges dreidimensionales Gerüst für den Herzklappenersatz erstellt.

Vor dem Einsatz im Menschen sind weitere Optimierungen der Prothesen und eine ausführliche *in vivo* Erprobung notwendig. Optimierungsmöglichkeiten bestehen im technischen Ablauf der Dezellularisierung. Automatisierte Verfahren sind hier vielversprechend. Pellegata, A.F., et al. haben ein derartiges System entwickelt. Dabei konnten sie zeigen, dass automatisierte Verfahren manuellen nicht unterlegen sind [147]. Bedeutende Vorteile sind hier ein geringeres Risiko für Kontaminationen, ein geringerer personeller Aufwand und eine hohe Standardisierung.

Ein weiteres erstrebenswertes Ziel ist die kontinuierliche Kontrolle des Dezellularisierungsfortschritts während des laufenden Verfahrens. Hier wird ein interessanter Ansatz von Hülsmann, J., et al. beschrieben. Die Beurteilung des Dezellularisierungsfortschritts erfolgte über die rheologische Analyse des Perfusats [148]. Dies ermöglicht eine an das Gewebe adaptierte Dezellularisierung mit simultaner Erfolgskontrolle.

Die Biokompatibilität der generierten Prothesen kann durch die innovativen Technologien des *Tissue Engineerings* weiter verbessert werden. Das „*Guided Tissue Engineering*“, die Beschichtung der Grundgerüste mit beispielsweise Fibronectin, VEGF oder *heparin-SDF-1alpha* [52, 104] im Sinne eines „*Drug Delivery Devices*“ [149], kann die *in vivo* Rebesiedelung beschleunigen und hierdurch das Komplikationsrisiko unmittelbar nach der Implantation verringern. Auch eine kontrollierte Rebesiedelung der Grundgerüste unter spezifischer mechanischer Stimulation in Bioreaktoren vor der Implantation kann zu einer Verbesserung der Prothesen beitragen [58, 150].

Aktuell ist Anwendung der Nanotechnologie im Bereich des *Tissue Engineerings* vielversprechend. Kim, D.H., et al. erreichten beispielsweise durch eine gezielte Anordnung der Nanotopographie von Matrigelen eine vermehrte Poliferation, Migration und Differenzierung kardialer Progenitorzellen [151]. Eine derartige Modulation der Oberfläche der dezellularisierten Prothesen ist denkbar und ein spannender Forschungsansatz.

Die Konzeption von *tissue engineerter* Herzklappenprothesen, die sich für eine kathetergestützte Implantation eignen ist ein weiteres Ziel. Für die Pulmonalklappenposition haben Schlegel, F., et al. im Schweinmodell zeigen können, dass dies prinzipiell möglich ist [86]. Die Perfektionierung dieser Technik könnte *Tissue Engineerte* Herzklappenprothesen weiteren Patienten zugänglich machen.

Die steigenden Fallzahlen untermauern die Anstrengungen im Bereich der Entwicklung eines optimalen Herzklappenersatzes. In den letzten 10 Jahren sind auf dem Gebiet des kardiovaskulären *Tissue Engineerings* große Fortschritte gemacht worden. Die stetige Weiterentwicklung der bestehenden Techniken und die Anwendung neuer Techniken (Nanotechnologie, 3D Drucker, uvm.), lassen

den Ersatz der derzeitigen komplikationsbehafteten Standardtherapieverfahren in greifbare Nähe rücken.

5. Literaturverzeichnis

1. Nkomo, V.T., J.M. Gardin, T.N. Skelton, J.S. Gottdiener, C.G. Scott, and M. Enriquez-Sarano, *Burden of valvular heart diseases: a population-based study*. The Lancet, 2006. **368**(9540): p. 1005-1011.
2. Supino, P.G., J.S. Borer, J. Preibisz, and A. Bornstein, *The epidemiology of valvular heart disease: a growing public health problem*. Heart Fail Clin, 2006. **2**(4): p. 379-93.
3. Hoffman, J.I. and S. Kaplan, *The incidence of congenital heart disease*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(12): p. 1890-900.
4. Beckmann, A., A.K. Funkat, J. Lewandowski, M. Frie, M. Ernst, K. Hekmat, W. Schiller, J.F. Gummert, and J.T. Cremer, *Cardiac Surgery in Germany during 2014: A Report on Behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Thorac Cardiovasc Surg, 2015. **63**(4): p. 258-69.
5. lung, B. and A. Vahanian, *Epidemiology of acquired valvular heart disease*. Can J Cardiol, 2014. **30**(9): p. 962-70.
6. lung, B., *A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease*. European Heart Journal, 2003. **24**(13): p. 1231-1243.
7. Perera, S., N. Wijesinghe, E. Ly, G. Devlin, and S. Pasupati, *Outcomes of patients with untreated severe aortic stenosis in real-world practice*. N Z Med J, 2011. **124**(1345): p. 40-8.
8. Nishimura, R.A., C.M. Otto, R.O. Bonow, B.A. Carabello, J.P. Erwin, 3rd, R.A. Guyton, P.T. O'Gara, C.E. Ruiz, N.J. Skubas, P. Sorajja, T.M. Sundt, 3rd, J.D. Thomas, and G. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice, *2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(22): p. e57-185.
9. Carapetis, J.R., A.C. Steer, E.K. Mulholland, and M. Weber, *The global burden of group A streptococcal diseases*. The Lancet Infectious Diseases, 2005. **5**(11): p. 685-694.
10. Carapetis, J.R., *Rheumatic Heart Disease in Developing Countries*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(5): p. 439-441.
11. Yacoub, M.H. and J.J. Takkenberg, *Will heart valve tissue engineering change the world?* Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2005. **2**(2): p. 60-1.
12. Akhyari, P., P. Minol, A. Assmann, M. Barth, H. Kamiya, and A. Lichtenberg, *[Tissue engineering of heart valves]*. Chirurg, 2011. **82**(4): p. 311-8.
13. Pibarot, P. and J.G. Dumesnil, *Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management*. Circulation, 2009. **119**(7): p. 1034-48.
14. Singhal, P., A. Luk, and J. Butany, *Bioprosthetic Heart Valves: Impact of Implantation on Biomaterials*. ISRN Biomaterials, 2013. **2013**: p. 14.
15. Chan, V., B.K. Lam, F.D. Rubens, P. Hendry, R. Masters, T.G. Mesana, and M. Ruel, *Long-term evaluation of biological versus mechanical prosthesis use at reoperative aortic valve replacement*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2012. **144**(1): p. 146-51.

16. Misawa, Y., *Valve-related complications after mechanical heart valve implantation*. Surgery Today, 2014.
17. Hammermeister, K., G.K. Sethi, W.G. Henderson, F.L. Grover, C. Oprian, and S.H. Rahimtoola, *Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(4): p. 1152-8.
18. Oxenham, H., P. Bloomfield, D.J. Wheatley, R.J. Lee, J. Cunningham, R.J. Prescott, and H.C. Miller, *Twenty year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses*. Heart, 2003. **89**(7): p. 715-21.
19. Edmunds, L.H., Jr., R.E. Clark, L.H. Cohn, G.L. Grunkemeier, D.C. Miller, and R.D. Weisel, *Guidelines for reporting morbidity and mortality after cardiac valvular operations*. Eur J Cardiothorac Surg, 1996. **10**(9): p. 812-6.
20. Hoerstrup, S.P. and B. Weber, *Biological heart valves*. Eur Heart J, 2015. **36**(6): p. 325-6.
21. Barnett, S.D. and N. Ad, *Surgery for aortic and mitral valve disease in the United States: a trend of change in surgical practice between 1998 and 2005*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(6): p. 1422-9.
22. Attia, R., N. Papalexopoulou, J. Hancock, C. Young, M. Thomas, and V. Bapat, *Successful treatment of failing biological prosthesis because of "Stent creep" with valve-in-valve transcatheter aortic valve implantation*. Catheter Cardiovasc Interv, 2015. **86**(2): p. E119-25.
23. Codner, P., A. Assali, H. Vaknin-Assa, Y. Shapira, K. Orvin, R. Sharony, A. Sagie, and R. Kornowski, *Treatment of Aortic, Mitral and Tricuspid Structural Bioprosthetic Valve Deterioration Using the Valve-in-Valve Technique*. J Heart Valve Dis, 2015. **24**(3): p. 345-52.
24. Tweddell, J.S., A.N. Pelech, R.D. Jaquiss, P.C. Frommelt, K.A. Mussatto, G.M. Hoffman, and S.B. Litwin, *Aortic valve repair*. Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu, 2005: p. 112-21.
25. Sharma, V., R.M. Suri, J.A. Dearani, H.M. Burkhart, S.J. Park, L.D. Joyce, Z. Li, and H.V. Schaff, *Expanding relevance of aortic valve repair-is earlier operation indicated?* J Thorac Cardiovasc Surg, 2014. **147**(1): p. 100-7.
26. Gammie, J.S., S. Sheng, B.P. Griffith, E.D. Peterson, J.S. Rankin, S.M. O'Brien, and J.M. Brown, *Trends in Mitral Valve Surgery in the United States: Results From The Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac Database*. The Annals of Thoracic Surgery, 2009. **87**(5): p. 1431-1439.
27. Zhou, Y., B. Leobon, P. Berthoumieu, D. Roux, Y. Glock, Y. Mei, Y. Wang, and G. Fournial, *Long-Term Outcomes following Repair or Replacement in Degenerative Mitral Valve Disease*. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon, 2010. **58**(07): p. 415-421.
28. Enriquez-Sarano, M., H.V. Schaff, T.A. Orszulak, A.J. Tajik, K.R. Bailey, and R.L. Frye, *Valve repair improves the outcome of surgery for mitral regurgitation. A multivariate analysis*. Circulation, 1995. **91**(4): p. 1022-8.
29. Ross, D.N., *Homograft replacement of the aortic valve*. Lancet, 1962. **2**(7254): p. 487.
30. Elkins, R.C., C.J. Knott-Craig, K.E. Ward, C. McCue, and M.M. Lane, *Pulmonary autograft in children: realized growth potential*. Ann Thorac Surg, 1994. **57**(6): p. 1387-93; discussion 1393-4.
31. Stelzer, P., *The Ross procedure: state of the art 2011*. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2011. **23**(2): p. 115-23.

32. Delmo Walter, E.M., T. de By, R. Meyer, and R. Hetzer, *The future of heart valve banking and of homografts: perspective from the Deutsches Herzzentrum Berlin*. HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth, 2012. **4**(2): p. 97-108.
33. Sievers, H.H., U. Stierle, E.I. Charitos, J.J. Takkenberg, J. Horer, R. Lange, U. Franke, M. Albert, A. Gorski, R.G. Leyh, A. Riso, J. Sachweh, A. Moritz, R. Hetzer, and W. Hemmer, *A multicentre evaluation of the autograft procedure for young patients undergoing aortic valve replacement: update on the German Ross Registry*. Eur J Cardiothorac Surg, 2015.
34. Takkenberg, J.J., L.M. Klieverik, P.H. Schoof, R.J. van Suylen, L.A. van Herwerden, P.E. Zondervan, J.W. Roos-Hesselink, M.J. Eijkemans, M.H. Yacoub, and A.J. Bogers, *The Ross procedure: a systematic review and meta-analysis*. Circulation, 2009. **119**(2): p. 222-8.
35. Juthier, F., A. Vincentelli, C. Pincon, C. Banfi, P.V. Ennezat, S. Marechaux, and A. Prat, *Reoperation after the Ross procedure: incidence, management, and survival*. Ann Thorac Surg, 2012. **93**(2): p. 598-604; discussion 605.
36. Brown, J.W., P.M. Patel, M.D. Rodefeld, and M.W. Turrentine, *The Ross operation in adolescents*. World J Pediatr Congenit Heart Surg, 2013. **4**(4): p. 403-11.
37. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
38. Rippel, R.A., H. Ghanbari, and A.M. Seifalian, *Tissue-engineered heart valve: future of cardiac surgery*. World J Surg, 2012. **36**(7): p. 1581-91.
39. Dohmen, P.M., *Clinical results of implanted tissue engineered heart valves*. HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth, 2012. **4**(4): p. 225-31.
40. Koo, M.A., J.K. Kang, M.H. Lee, H.J. Seo, B.J. Kwon, K.E. You, M.S. Kim, D. Kim, and J.C. Park, *Stimulated migration and penetration of vascular endothelial cells into poly (L-lactic acid) scaffolds under flow conditions*. Biomater Res, 2014. **18**.
41. Sodian, R., P. Schaefermeier, S. Abegg-Zips, W.M. Kuebler, M. Shakibaei, S. Daebritz, J. Ziegelmueller, C. Schmitz, and B. Reichart, *Use of Human Umbilical Cord Blood-Derived Progenitor Cells for Tissue-Engineered Heart Valves*. The Annals of Thoracic Surgery, 2010. **89**(3): p. 819-828.
42. Sales, V.L., B.A. Mettler, G.C. Engelmayer, Jr., E. Aikawa, J. Bischoff, D.P. Martin, A. Exarhopoulos, M.A. Moses, F.J. Schoen, M.S. Sacks, and J.E. Mayer, Jr., *Endothelial progenitor cells as a sole source for ex vivo seeding of tissue-engineered heart valves*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(1): p. 257-67.
43. Tedder, M.E., A. Simionescu, J. Chen, J. Liao, and D.T. Simionescu, *Assembly and testing of stem cell-seeded layered collagen constructs for heart valve tissue engineering*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(1-2): p. 25-36.
44. Akhyari, P., H. Kamiya, P. Gwanmesia, H. Aubin, R. Tschierschke, S. Hoffmann, M. Karck, and A. Lichtenberg, *In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position*. Eur J Cardiothorac Surg, 2010. **38**(5): p. 539-46.
45. Weymann, A., B. Schmack, T. Okada, P. Soos, R. Istok, T. Radovits, B. Straub, E. Barnucz, S. Loganathan, I. Patzold, N. Chaimow, C. Schies, S. Korkmaz, U. Tochtermann, M. Karck, and G. Szabo, *Reendothelialization of human heart valve neoscaffolds using umbilical cord-derived endothelial cells*. Circ J, 2013. **77**(1): p. 207-16.

46. *Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review*. International Journal of Polymer Science, 2011. **2011**.
47. Ellingsworth, L.R., F. DeLustro, J.E. Brennan, S. Sawamura, and J. McPherson, *The human immune response to reconstituted bovine collagen*. J Immunol, 1986. **136**(3): p. 877-82.
48. Leyh, R.G., M. Wilhelmi, T. Walles, K. Kallenbach, P. Rebe, A. Oberbeck, T. Herden, A. Haverich, and H. Mertsching, *Acellularized porcine heart valve scaffolds for heart valve tissue engineering and the risk of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **126**(4): p. 1000-4.
49. Eastlund, T., *Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection*. Cell Transplant, 1995. **4**(5): p. 455-77.
50. Boneva, R.S., T.M. Folks, and L.E. Chapman, *Infectious Disease Issues in Xenotransplantation*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(1): p. 1-14.
51. Jana, S., B.J. Tefft, D.B. Spoon, and R.D. Simari, *Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves*. Acta Biomater, 2014. **10**(7): p. 2877-93.
52. Assmann, A., C. Delfs, H. Munakata, F. Schiffer, K. Horstkotter, K. Huynh, M. Barth, V.R. Stoldt, H. Kamiya, U. Boeken, A. Lichtenberg, and P. Akhyari, *Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating*. Biomaterials, 2013. **34**(25): p. 6015-26.
53. Kasimir, M.T., G. Weigel, J. Sharma, E. Rieder, G. Seebacher, E. Wolner, and P. Simon, *The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation*. Thromb Haemost, 2005. **94**(3): p. 562-7.
54. Macchiarini, P., P. Jungebluth, T. Go, M.A. Asnaghi, L.E. Rees, T.A. Cogan, A. Dodson, J. Martorell, S. Bellini, P.P. Parnigotto, S.C. Dickinson, A.P. Hollander, S. Mantero, M.T. Conconi, and M.A. Birchall, *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway*. Lancet, 2008. **372**(9655): p. 2023-30.
55. Gonfiotti, A., M.O. Jaus, D. Barale, S. Baiguera, C. Comin, F. Lavorini, G. Fontana, O. Sibila, G. Rombola, P. Jungebluth, and P. Macchiarini, *The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results*. Lancet, 2014. **383**(9913): p. 238-44.
56. Atala, A., S.B. Bauer, S. Soker, J.J. Yoo, and A.B. Retik, *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty*. Lancet, 2006. **367**(9518): p. 1241-6.
57. da Costa, F.D., A.C. Costa, R. Prestes, A.C. Domanski, E.M. Balbi, A.D. Ferreira, and S.V. Lopes, *The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts*. Ann Thorac Surg, 2010. **90**(6): p. 1854-60.
58. Lichtenberg, A., I. Tudorache, S. Cebotari, M. Suprunov, G. Tudorache, H. Goerler, J.K. Park, D. Hilfiker-Kleiner, S. Ringes-Lichtenberg, M. Karck, G. Brandes, A. Hilfiker, and A. Haverich, *Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I559-65.
59. Tudorache, I., A. Horke, S. Sarikouch, A. Ciubotaru, T. Breyman, D. Boethig, P. Beerbaum, H. Bertram, M. Westhoff-Bleck, L. Meschenmoser, S. Cebotari, and A. Haverich, *Abstract 19959: Aortic Valve Replacement with Decellularized Aortic Allografts: First Clinical Results*. Circulation, 2014. **130**(Suppl 2): p. A19959.

60. Perri, G., A. Polito, C. Esposito, S.B. Albanese, P. Francalanci, G. Pongiglione, and A. Carotti, *Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction in patients with congenital heart disease*. Eur J Cardiothorac Surg, 2012. **41**(6): p. 1320-5.
61. Cheung, D.Y., B. Duan, and J.T. Butcher, *Current progress in tissue engineering of heart valves: multiscale problems, multiscale solutions*. Expert Opin Biol Ther, 2015. **15**(8): p. 1155-72.
62. Ruffer, A., A. Purbojo, I. Cicha, M. Glockler, S. Potapov, S. Dittrich, and R.A. Cesnjevar, *Early failure of xenogenous de-cellularised pulmonary valve conduits--a word of caution!* Eur J Cardiothorac Surg, 2010. **38**(1): p. 78-85.
63. Cicha, I., A. Ruffer, R. Cesnjevar, M. Glockler, A. Agaimy, W.G. Daniel, C.D. Garlichs, and S. Dittrich, *Early obstruction of decellularized xenogenic valves in pediatric patients: involvement of inflammatory and fibroproliferative processes*. Cardiovasc Pathol, 2011. **20**(4): p. 222-31.
64. Kasimir, M.T., E. Rieder, G. Seebacher, A. Nigisch, B. Dekan, E. Wolner, G. Weigel, and P. Simon, *Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves*. J Heart Valve Dis, 2006. **15**(2): p. 278-86; discussion 286.
65. Wong, M.L. and L.G. Griffiths, *Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: antigen removal vs. decellularization*. Acta Biomater, 2014. **10**(5): p. 1806-16.
66. Misfeld, M. and H.-H. Sievers, *Heart valve macro- and microstructure*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007. **362**(1484): p. 1421-1436.
67. Ghasemi-Mobarakeh, L., M.P. Prabhakaran, L. Tian, E. Shamirzaei-Jeshvaghani, L. Dehghani, and S. Ramakrishna, *Structural properties of scaffolds: Crucial parameters towards stem cells differentiation*. World J Stem Cells, 2015. **7**(4): p. 728-44.
68. Griffin, M.F., P.E. Butler, A.M. Seifalian, and D.M. Kalaskar, *Control of stem cell fate by engineering their micro and nanoenvironment*. World J Stem Cells, 2015. **7**(1): p. 37-50.
69. You, M., G. Peng, J. Li, P. Ma, Z. Wang, W. Shu, S. Peng, and G.Q. Chen, *Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds coated with PHA granule binding protein PhaP fused with RGD peptide*. Biomaterials, 2011. **32**(9): p. 2305-13.
70. Ayala, R., C. Zhang, D. Yang, Y. Hwang, A. Aung, S.S. Shroff, F.T. Arce, R. Lal, G. Arya, and S. Varghese, *Engineering the cell-material interface for controlling stem cell adhesion, migration, and differentiation*. Biomaterials, 2011. **32**(15): p. 3700-11.
71. Yim, E.K.F., S.W. Pang, and K.W. Leong, *Synthetic Nanostructures Inducing Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Neuronal Lineage*. Exp Cell Res, 2007. **313**(9): p. 1820-9.
72. Moroni, F. and T. Mirabella, *Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering*. Am J Stem Cells, 2014. **3**(1): p. 1-20.
73. Bodnar, E., E.G. Olsen, R. Florio, and J. Dobrin, *Damage of porcine aortic valve tissue caused by the surfactant sodiumdodecylsulphate*. Thorac Cardiovasc Surg, 1986. **34**(2): p. 82-5.

74. Cebotari, S., I. Tudorache, T. Jaekel, A. Hilfiker, S. Dorfman, W. Ternes, A. Haverich, and A. Lichtenberg, *Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells*. *Artif Organs*, 2010. **34**(3): p. 206-10.
75. Caamano, S., A. Shiori, S.H. Strauss, and E.C. Orton, *Does sodium dodecyl sulfate wash out of detergent-treated bovine pericardium at cytotoxic concentrations?* *J Heart Valve Dis*, 2009. **18**(1): p. 101-5.
76. Boer, U., A. Lohrenz, M. Klingenberg, A. Pich, A. Haverich, and M. Wilhelmi, *The effect of detergent-based decellularization procedures on cellular proteins and immunogenicity in equine carotid artery grafts*. *Biomaterials*, 2011. **32**(36): p. 9730-7.
77. Gillies, A.R., L.R. Smith, R.L. Lieber, and S. Varghese, *Method for decellularizing skeletal muscle without detergents or proteolytic enzymes*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011. **17**(4): p. 383-9.
78. Fishman, J.M., T. Ansari, P. Sibbons, P. De Coppi, and M.A. Birchall, *Decellularized rabbit cricoarytenoid dorsalis muscle for laryngeal regeneration*. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2012. **121**(2): p. 129-38.
79. Fishman, J.M., M.W. Lowdell, L. Urbani, T. Ansari, A.J. Burns, M. Turmaine, J. North, P. Sibbons, A.M. Seifalian, K.J. Wood, M.A. Birchall, and P. De Coppi, *Immunomodulatory effect of a decellularized skeletal muscle scaffold in a discordant xenotransplantation model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(35): p. 14360-5.
80. Nèeman, I., L. Fishelson, and Y. Kashman, *Isolation of a new toxin from the sponge *Latrunculia magnifica* in the Gulf of Aquaba (Red Sea)*. *Marine Biology*, 1975. **30**(4): p. 293-296.
81. Spector, I., N.R. Shochet, Y. Kashman, and A. Groweiss, *Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells*. *Science*, 1983. **219**(4584): p. 493-5.
82. Welsch, U. and J. Sobotta, *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen ; [online Zugang + interaktive Extras]*. 2006: Elsevier, Urban & Fischer.
83. Assmann, A., P. Akhyari, C. Delfs, U. Flogel, C. Jacoby, H. Kamiya, and A. Lichtenberg, *Development of a growing rat model for the in vivo assessment of engineered aortic conduits*. *J Surg Res*, 2012. **176**(2): p. 367-75.
84. Assmann, A., K. Horstkotter, H. Munakata, F. Schiffer, C. Delfs, K. Zwirnmann, M. Barth, P. Akhyari, and A. Lichtenberg, *Simvastatin does not diminish the in vivo degeneration of decellularized aortic conduits*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014. **64**(4): p. 332-42.
85. Baraki, H., I. Tudorache, M. Braun, K. Höfler, A. Görler, A. Lichtenberg, C. Bara, A. Calistru, G. Brandes, M. Hewicker-Trautwein, A. Hilfiker, A. Haverich, and S. Cebotari, *Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model*. *Biomaterials*, 2009. **30**(31): p. 6240-6246.
86. Schlegel, F., A. Salameh, K. Oelmann, M. Halling, S. Dhein, F.W. Mohr, and P.M. Dohmen, *Injectable Tissue-Engineered Pulmonary Heart Valve Implantation Into the Pig Model: A Feasibility Study*. *Med Sci Monit Basic Res*, 2015. **21**: p. 135-40.
87. Movat, H.Z., *Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains*. *AMA Arch Pathol*, 1955. **60**(3): p. 289-95.

88. Timpl, R. and M. Aumailley, *Biochemistry of basement membranes*. Adv Nephrol Necker Hosp, 1989. **18**: p. 59-76.
89. Liliensiek, S.J., P. Nealey, and C.J. Murphy, *Characterization of Endothelial Basement Membrane Nanotopography in Rhesus Macaque as a Guide for Vessel Tissue Engineering*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(9): p. 2643-51.
90. Junqueira, L.C.U., G. Bignolas, and R.R. Brentani, *A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen*. Analytical Biochemistry, 1979. **94**(1): p. 96-99.
91. Joseph, J., L. Joseph, N.S. Shekhawat, S. Devi, J. Wang, R.B. Melchert, M. Hauer-Jensen, and R.H. Kennedy, *Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2003. **285**(2): p. H679-H686.
92. Akhyari, P., H. Aubin, P. Gwanmesia, M. Barth, S. Hoffmann, J. Huelsmann, K. Preuss, and A. Lichtenberg, *The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities*. Tissue Eng Part C Methods, 2011. **17**(9): p. 915-26.
93. Syedain, Z.H., A.R. Bradee, S. Kren, D.A. Taylor, and R.T. Tranquillo, *Decellularized tissue-engineered heart valve leaflets with recellularization potential*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**(5-6): p. 759-69.
94. Rieder, E., A. Nigisch, B. Dekan, M.-T. Kasimir, F. Mühlbacher, E. Wolner, P. Simon, and G. Weigel, *Granulocyte-based immune response against decellularized or glutaraldehyde cross-linked vascular tissue*. Biomaterials, 2006. **27**(33): p. 5634-5642.
95. Keane, T.J., R. Londono, N.J. Turner, and S.F. Badylak, *Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response*. Biomaterials, 2012. **33**(6): p. 1771-1781.
96. Qiagen, *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*, Qiagen, Editor. Third Edition, April 2010, Qiagen. p. 33-37.
97. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
98. Burnette, W.N., "Western Blotting": *Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Analytical Biochemistry, 1981. **112**(2): p. 195-203.
99. Bratosin, D., L. Mitrofan, C. Palii, J. Estaquier, and J. Montreuil, *Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging*. Cytometry A, 2005. **66**(1): p. 78-84.
100. Althouse, G.C. and S.M. Hopkins, *Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores*. Theriogenology, 1995. **43**(3): p. 595-603.
101. Shah, S., P.T. Yin, T.M. Uehara, S.-T.D. Chueng, L. Yang, and K.-B. Lee, *Guiding Stem Cell Differentiation into Oligodendrocytes Using Graphene-Nanofiber Hybrid Scaffolds*. Advanced Materials, 2014. **26**(22): p. 3673-3680.
102. Shi, Z., K.G. Neoh, E.T. Kang, C.K. Poh, and W. Wang, *Enhanced endothelial differentiation of adipose-derived stem cells by substrate nanotopography*. J Tissue Eng Regen Med, 2014. **8**(1): p. 50-8.

103. Ardeniz, O., S. Unger, H. Onay, S. Ammann, C. Keck, C. Cianga, B. Gerceker, B. Martin, I. Fuchs, U. Salzer, A. Ikinciogullari, D. Guloglu, T. Dereli, R. Thimme, S. Ehl, K. Schwarz, A. Schmitt-Graeff, P. Cianga, P. Fisch, and K. Warnatz, *beta2-Microglobulin deficiency causes a complex immunodeficiency of the innate and adaptive immune system*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **136**(2): p. 392-401.
104. Zhou, J., X. Ye, Z. Wang, J. Liu, B. Zhang, J. Qiu, Y. Sun, H. Li, and Q. Zhao, *Development of decellularized aortic valvular conduit coated by heparin-SDF-1alpha multilayer*. Ann Thorac Surg, 2015. **99**(2): p. 612-8.
105. Khorramirouz, R., S. Sabetkish, A. Akbarzadeh, A. Muhammadnejad, R. Heidari, and A.M. Kajbafzadeh, *Effect of three decellularisation protocols on the mechanical behaviour and structural properties of sheep aortic valve conduits*. Adv Med Sci, 2014. **59**(2): p. 299-307.
106. Friedrich, L.H., P. Jungebluth, S. Sjoqvist, V. Lundin, J.C. Haag, G. Lemon, Y. Gustafsson, F. Ajallouelian, A. Sotnichenko, H. Kielstein, M.A. Burguillos, B. Joseph, A.I. Teixeira, M.L. Lim, and P. Macchiarini, *Preservation of aortic root architecture and properties using a detergent-enzymatic perfusion protocol*. Biomaterials, 2014. **35**(6): p. 1907-13.
107. Stephens, E.H., N. de Jonge, M.P. McNeill, C.A. Durst, and K.J. Grande-Allen, *Age-related changes in material behavior of porcine mitral and aortic valves and correlation to matrix composition*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(3): p. 867-78.
108. Lelovas, P.P., N.G. Kostomitsopoulos, and T.T. Xanthos, *A Comparative Anatomic and Physiologic Overview of the Porcine Heart*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2014. **53**(5): p. 432-8.
109. Schuster, A., I. Grunwald, A. Chiribiri, R. Southworth, M. Ishida, G. Hay, N. Neumann, G. Morton, D. Perera, T. Schaeffter, and E. Nagel, *An isolated perfused pig heart model for the development, validation and translation of novel cardiovascular magnetic resonance techniques*. J Cardiovasc Magn Reson, 2010. **12**: p. 53.
110. Paniagua Gutierrez J , R., H. Berry, S. Korossis, S. Mirsadraee, S.V. Lopes, F. da Costa, J. Kearney, K. Watterson, J. Fisher, and E. Ingham, *Regenerative Potential of Low-Concentration SDS-Decellularized Porcine Aortic Valved Conduits In Vivo*. Tissue Eng Part A, 2015. **21**(1-2): p. 332-42.
111. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
112. Montoya, C.V. and P.S. McFetridge, *Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization*. Tissue Eng Part C Methods, 2009. **15**(2): p. 191-200.
113. Bhuyan, A.K., *On the mechanism of SDS-induced protein denaturation*. Biopolymers, 2010. **93**(2): p. 186-99.
114. Bloch, O., W. Erdbrugger, W. Volker, A. Schenk, S. Posner, W. Konertz, and P.M. Dohmen, *Extracellular matrix in deoxycholic acid decellularized aortic heart valves*. Med Sci Monit, 2012. **18**(12): p. Br487-92.
115. Stannard, J.N. and B.L. Horecker, *The in vitro inhibition of cytochrome oxidase by azide and cyanide*. Fed Proc, 1947. **6**(1 Pt 2): p. 210.
116. Lichstein, H.C. and M.H. Soule, *Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration: I. The Action of Sodium Azide on Microbic Growth*. J Bacteriol, 1944. **47**(3): p. 221-30.

117. Zhang, Y. and P.S. Cremer, *Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series*. Curr Opin Chem Biol, 2006. **10**(6): p. 658-63.
118. Baldwin, R.L., *How Hofmeister ion interactions affect protein stability*. Biophys J, 1996. **71**(4): p. 2056-63.
119. Meyer, S.R., B. Chiu, T.A. Churchill, L. Zhu, J.R. Lakey, and D.B. Ross, *Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat*. J Biomed Mater Res A, 2006. **79**(2): p. 254-62.
120. Schenke-Layland, K., F. Opitz, M. Gross, C. Doring, K.J. Halbhuber, F. Schirrmeister, T. Wahlers, and U.A. Stock, *Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an in vitro study*. Cardiovasc Res, 2003. **60**(3): p. 497-509.
121. Zou, Y. and Y. Zhang, *Mechanical evaluation of decellularized porcine thoracic aorta*. J Surg Res, 2012. **175**(2): p. 359-68.
122. Saghizadeh, M., M.A. Winkler, A.A. Kramerov, D.M. Hemmati, C.A. Ghiam, S.D. Dimitrijevic, D. Sareen, L. Ornelas, H. Ghiasi, W.J. Brunken, E. Maguen, Y.S. Rabinowitz, C.N. Svendsen, K. Jirsova, and A.V. Ljubimov, *A simple alkaline method for decellularizing human amniotic membrane for cell culture*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79632.
123. Faulk, D.M., C.A. Carruthers, H.J. Warner, C.R. Kramer, J.E. Reing, L. Zhang, A. D'Amore, and S.F. Badylak, *The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material*. Acta Biomaterialia, 2014. **10**(1): p. 183-193.
124. Schaner, P.J., N.D. Martin, T.N. Tulenko, I.M. Shapiro, N.A. Tarola, R.F. Leichter, R.A. Carabasi, and P.J. DiMuzio, *Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering*. Journal of Vascular Surgery, 2004. **40**(1): p. 146-153.
125. Kuhn, K., *Basement membrane (type IV) collagen*. Matrix Biol, 1995. **14**(6): p. 439-45.
126. Grande-Allen, K.J., W.J. Mako, A. Calabro, Y. Shi, N.B. Ratliff, and I. Vesely, *Loss of chondroitin 6-sulfate and hyaluronan from failed porcine bioprosthetic valves*. J Biomed Mater Res A, 2003. **65**(2): p. 251-9.
127. Wight TN, H.D., Hascall VC., *Proteoglycans. Structure and Function*. Cell biology of extracellular matrix, 1991(New York: Plenum Press): p. 45-78.
128. Lovekamp, J.J., D.T. Simionescu, J.J. Mercuri, B. Zubiato, M.S. Sacks, and N.R. Vyavahare, *Stability and function of glycosaminoglycans in porcine bioprosthetic heart valves*. Biomaterials, 2006. **27**(8): p. 1507-18.
129. Taylor, K.R. and R.L. Gallo, *Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation*. Faseb j, 2006. **20**(1): p. 9-22.
130. Nagata, S., R. Hanayama, and K. Kawane, *Autoimmunity and the clearance of dead cells*. Cell, 2010. **140**(5): p. 619-30.
131. Gilbert, T.W., J.M. Freund, and S.F. Badylak, *Quantification of DNA in biologic scaffold materials*. J Surg Res, 2009. **152**(1): p. 135-9.
132. Lodish H, B.A., Zipursky SL, et al., *Molecular Cell Biology. 4th edition. Section 18.1, The Actin Cytoskeleton*. 2000: New York: W. H. Freeman. Section 18.1, The Actin Cytoskeleton.
133. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006. **27**(19): p. 3675-3683.
134. Rieder, E., G. Seebacher, M.T. Kasimir, E. Eichmair, B. Winter, B. Dekan, E. Wolner, P. Simon, and G. Weigel, *Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in*

- residual potential to attract monocytic cells.* Circulation, 2005. **111**(21): p. 2792-7.
135. Boeer, U., F.F. Buettner, M. Klingenberg, G.C. Antonopoulos, H. Meyer, A. Haverich, and M. Wilhelmi, *Immunogenicity of intensively decellularized equine carotid arteries is conferred by the extracellular matrix protein collagen type VI.* PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105964.
 136. Galili, U., S.B. Shohet, E. Kobrin, C.L. Stults, and B.A. Macher, *Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells.* J Biol Chem, 1988. **263**(33): p. 17755-62.
 137. Cooper, D.K., A.H. Good, E. Koren, R. Oriol, A.J. Malcolm, R.M. Ippolito, F.A. Neethling, Y. Ye, E. Romano, and N. Zuhdi, *Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man.* Transpl Immunol, 1993. **1**(3): p. 198-205.
 138. Kuwaki, K., Y.L. Tseng, F.J. Dor, A. Shimizu, S.L. Houser, T.M. Sanderson, C.J. Lancos, D.D. Prabharasuth, J. Cheng, K. Moran, Y. Hisashi, N. Mueller, K. Yamada, J.L. Greenstein, R.J. Hawley, C. Patience, M. Awwad, J.A. Fishman, S.C. Robson, H.J. Schuurman, D.H. Sachs, and D.K. Cooper, *Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience.* Nat Med, 2005. **11**(1): p. 29-31.
 139. Konakci, K.Z., B. Bohle, R. Blumer, W. Hoetzenecker, G. Roth, B. Moser, G. Boltz-Nitulescu, M. Gorlitzer, W. Klepetko, E. Wolner, and H.J. Ankersmit, *Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery.* Eur J Clin Invest, 2005. **35**(1): p. 17-23.
 140. Vyavahare, N., M. Ogle, F.J. Schoen, R. Zand, D.C. Gloeckner, M. Sacks, and R.J. Levy, *Mechanisms of bioprosthetic heart valve failure: fatigue causes collagen denaturation and glycosaminoglycan loss.* J Biomed Mater Res, 1999. **46**(1): p. 44-50.
 141. Shah, S.R. and N.R. Vyavahare, *The effect of glycosaminoglycan stabilization on tissue buckling in bioprosthetic heart valves.* Biomaterials, 2008. **29**(11): p. 1645-1653.
 142. Eckert, C.E., R. Fan, B. Mikulis, M. Barron, C.A. Carruthers, V.M. Friebe, N.R. Vyavahare, and M.S. Sacks, *On the Biomechanical Role of Glycosaminoglycans in the Aortic Heart Valve Leaflet.* Acta Biomater, 2013. **9**(1): p. 4653-60.
 143. Jorge-Herrero, E., P. Fernandez, M. Gutierrez, and J.L. Castillo-Olivares, *Study of the calcification of bovine pericardium: analysis of the implication of lipids and proteoglycans.* Biomaterials, 1991. **12**(7): p. 683-9.
 144. Assmann, A., M. Struss, F. Schiffer, F. Heidelberg, H. Munakata, E.V. Timchenko, P.E. Timchenko, T. Kaufmann, K. Huynh, Y. Sugimura, Q. Leidl, A. Pinto, V.R. Stoldt, A. Lichtenberg, and P. Akhyari, *Improvement of the in vivo cellular repopulation of decellularized cardiovascular tissues by a detergent-free, non-proteolytic, actin-disassembling regimen.* J Tissue Eng Regen Med, 2017.
 145. Zhou, J., O. Fritze, M. Schleicher, H.P. Wendel, K. Schenke-Layland, C. Harasztosi, S. Hu, and U.A. Stock, *Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity.* Biomaterials, 2010. **31**(9): p. 2549-54.

146. Gratzner, P.F., R.D. Harrison, and T. Woods, *Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix*. Tissue Eng, 2006. **12**(10): p. 2975-83.
147. Pellegata, A.F., M.A. Asnaghi, S. Zonta, G. Zerbini, and S. Mantero, *A novel device for the automatic decellularization of biological tissues*. Int J Artif Organs, 2012. **35**(3): p. 191-8.
148. Hulsmann, J., H. Aubin, S.T. Bandesha, A. Kranz, V.R. Stoldt, A. Lichtenberg, and P. Akhyari, *Rheology of perfusates and fluid dynamical effects during whole organ decellularization: A perspective to individualize decellularization protocols for single organs*. Biofabrication, 2015. **7**(3): p. 035008.
149. Jana, S., R.D. Simari, D.B. Spoon, and A. Lerman, *Drug delivery in aortic valve tissue engineering*. J Control Release, 2014. **196**: p. 307-23.
150. Hulsmann, J., H. Aubin, A. Kranz, E. Godehardt, H. Munakata, H. Kamiya, M. Barth, A. Lichtenberg, and P. Akhyari, *A novel customizable modular bioreactor system for whole-heart cultivation under controlled 3D biomechanical stimulation*. J Artif Organs, 2013. **16**(3): p. 294-304.
151. Kim, D.H., Kshitiz, R.R. Smith, P. Kim, E.H. Ahn, H.N. Kim, E. Marban, K.Y. Suh, and A. Levchenko, *Nanopatterned cardiac cell patches promote stem cell niche formation and myocardial regeneration*. Integr Biol (Camb), 2012. **4**(9): p. 1019-33.

6. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich an erster Stelle bei meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. Alexander Assmann, der mir das Dissertationsthema überließ, mich in seine Arbeitsgruppe aufnahm und diese Arbeit in jeder Phase exzellent und mit außergewöhnlichem Engagement begleitet hat. Ohne diese vertrauensvolle und freundschaftliche Zusammenarbeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari, dem Leiter der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie, für die zahlreichen Impulse, die richtungsweisenden Ratschläge und die stetige Unterstützung bedanken.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg gilt mein Dank für die Möglichkeit diese Dissertation an der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf anfertigen zu können.

Der gesamten Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie von Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari möchte ich ebenfalls für die produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit herzlich danken. Frau Dr. Mareike Barth, Herr Dr. Arash Mehdiani, Herr Dr. Antonio Pinto, Herr Dr. Hiroshi Munakata, Frau Giesela Müller und Herr Hülsmann danke ich für methodische Anleitung und die anregenden Diskussionen. Meinen Mitdoktoranden und Freunden Alexander Kranz, Franziska Schiffer, Friederike Heidelberg, Kim Horstkötter und Christofer Delfs danke ich ganz besonders für die außergewöhnliche Unterstützung und Zusammenarbeit, welche die gemeinsame Zeit im Labor unvergesslich gemacht hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken denen diese Arbeit gewidmet ist. Ihnen verdanke ich mehr als Worte ausdrücken zu vermögen.

