

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

**Dezellularisierung und Charakterisierung von  
Perikard tierischen Ursprungs zur Herstellung  
von Herzklappen:  
Eine komparative Analyse**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Sonya El Amouri**

2019

---

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

gez.:

Dekan:	Prof. Dr. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter:	Prof. Dr. Artur Lichtenberg
Zweitgutachterin:	Prof. Dr. Cortese-Krott

---

## ZUSAMMENFASSUNG

Der prothetische Herzklappenersatz ist die einzige kausale Behandlungsmethode degenerativer Herzklappenerkrankungen, welche aufgrund der steigenden Lebenserwartung in Deutschland stetig zunehmen. Alle Arten aktuell eingesetzter Herzklappenprothesen sind natürlichen gesunden Herzklappen unterlegen.

Das Tissue Engineering von Herzklappen zielt darauf ab, Prothesen herzustellen, welche gesunde Herzklappen in Form, Funktion und Haltbarkeit imitieren. In der experimentellen Forschung wurden hierfür unterschiedliche Konzepte etabliert. Als Grundgerüst stehen bisher einerseits biokompatible synthetische Materialien und andererseits biologische Materialien zur Auswahl. Zu den biologischen Materialien gehören Herzklappen tierischen Ursprungs. Da die seit Jahrzehnten klinisch eingesetzten Herzklappen aus chemisch fixiertem bovinem und porcinem Perikard gute Ergebnisse gezeigt haben, widmen sich mehrere Arbeitsgruppen diesem Gewebe als Ausgangsmaterial für tissue engineerete Herzklappen. Zur Entfernung von immunogenem Material aus xenogenem Gewebe wurde die Methode der Dezellularisierung etabliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf detergenten- und enzymbasierte Protokolle, welche in vorliegenden Veröffentlichungen zur Dezellularisierung unterschiedlicher Gewebearten etabliert wurden, an bovinem und porcinem Perikard angewendet. Die Protokolle basierten auf folgende Reagenzien:

Protokoll I (Borschel-Protokoll): Glycerol, NaCl, EDTA, DCA, SDS, Triton X-100, PBS; Behandlungsdauer 16 Tage.

Protokoll II (Lichtenberg-Protokoll): SDS, DCA, PBS; Behandlungsdauer 6 Tage.

Protokoll III (Cebotari-Protokoll): Trypsin, EDTA, PBS; Behandlungsdauer 8 Tage.

Protokoll IV (Rieder-Protokoll): Triton X-100, DCA, IGEPAL, RNase, DNase, MgCl<sub>2</sub>, PBS; Behandlungsdauer 18 Tage.

Protokoll V (Tedder-Protokoll): DCA, Triton X-100, EDTA, HCl-Puffer, Ethanol, DNase, RNase, PBS, Elastase, CaCl<sub>2</sub>, Tris-Puffer; Behandlungsdauer 16 Tage.

Nach der Dezellularisierung wurde das dezellularisierte Perikard mittels histologischer und molekularbiologischer Verfahren auf potentiell immunogene Xenogene und auf Strukturveränderungen, und mittels biomechanischer Testungen auf mechanische Eigenschaften hin untersucht. Als Kontrollgruppe diente natives porcines und bovines Perikard.

Die Protokolle I bis III konnten keine ausreichende Entfernung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) erzielen. Protokoll IV konnte zwar eine ausreichende DNA Entfernung erzielen, jedoch keine vollständige Entfernung von Galactose-alpha-1,3-Galactose ( $\alpha$ -Gal). Lediglich Protokoll V konnte an porcinem Perikard eine ausreichende Eliminierung sowohl der DNA als auch von  $\alpha$ -Gal erreichen. An bovinem Perikard angewendet konnte Protokoll V zwar auch eine ausreichende DNA-Reduktion erzielen, jedoch war weiterhin  $\alpha$ -Gal nachweisbar. Somit erfüllt lediglich Protokoll V an porcinem Perikard angewendet die Kriterien einer erfolgreichen Dezellularisierung.

Histologisch haben die mit Protokoll I, II und V dezellularisierten Proben einen gut erhaltenen Kollagenfaserverband aufgewiesen. Die mit Protokoll III und IV dezellularisierten Proben haben eine aufgequollene Struktur der Extrazellulärmatrix aufgewiesen. Inwiefern dies das Potential zur Rebesiedlung reduziert bleibt offen.

Keines der verwendeten Protokolle hat zu einer signifikanten Veränderung des Elastizitätsmoduls geführt, trotz nachweislichem Verlust an Glykosaminoglykanen (GAG) durch nahezu alle Protokolle. Somit korreliert der Verlust an GAG nicht zwangsweise mit einer Beeinträchtigung des elastischen Verhaltens des Perikards.

Bovines Perikard hat deutlich höhere Elastizitätsmodul-Werte als porcines Perikard aufgewiesen. Ob dies eine Überlegenheit des einen oder anderen Perikardtyps beim Einsatz als Herzklappenprothese bedeutet, bleibt weiteren Studien vorbehalten.

Zusammenfassend wurde die höchste Antigenreduktion bei bestem Erhalt der strukturellen und mechanischen Eigenschaften in dem mit Protokoll V dezellularisiertem Perikard erreicht.

Anknüpfende Arbeiten sind nötig, um zu untersuchen, ob weitere Kriterien erfüllt sind, bevor das dezellularisierte Perikard als Matrix für tissue engineerete Herzklappen dienen kann. Hierzu gehört, dass das Gewebe von Endotoxinen frei sein muss, welche eine Rebesiedlung mit Zellen verhindern würden, und ferner, dass das Gewebe physiologischen Strömungsbedingungen standhalten muss.

---

## SUMMARY

Prosthetic heart valve replacement is the only option for a causal treatment of degenerative heart valve diseases, the latter showing a constantly increasing prevalence in Germany because of the rising life expectancy of the general population. All forms of currently used heart valve prostheses are inferior to the healthy native heart valves.

The aim of heart valve tissue engineering is to produce heart valve prostheses that imitate healthy heart valves in their shape, function and durability. Therefore, several concepts have been established in previous experimental research. As scaffolds for tissue engineered tissue, there is a choice between biocompatible synthetic materials on the one hand, and biological materials on the other hand. The group of biological materials includes animal derived heart valves.

Because the prostheses constructed based on bovine and porcine pericardium have showed good results during decades of clinical use, they are preferred by several groups as a starting material for tissue engineering of heart valves. However, in order to remove immunogenic material from the xenogeneic donor tissue, the method of decellularization has been established.

In the present work, five protocols based on detergents, or enzymes or a combination thereof, were applied to bovine and porcine pericardium. All protocols have been previously reported as efficient for decellularization of different types of tissues. The protocols were based on following reagents:

Protocol I (Borschel protocol): Glycerol, NaCl, EDTA, DCA, SDS, Triton X-100, PBS; duration of the protocol: 16 days.

Protocol II (Lichtenberg protocol): SDS, DCA, PBS. The Protocol has a duration of 6 days.

Protocol III (Cebotari protocol): Trypsin, EDTA, PBS; duration of the protocol: 8 days.

Protocol IV (Rieder protocol): Triton X-100, DCA, IGEPAL, RNase, DNase, MgCl<sub>2</sub>, PBS; duration of the protocol: 18 days.

Protocol V (Tedder protocol): DCA, Triton X-100, EDTA, HCl-Buffer, Ethanol, DNase, RNase, PBS, Elastase, CaCl<sub>2</sub>, Tris-Buffer; duration of the protocol: 16 days.

After decellularization, the pericardium was examined with the help of histological and molecular biological methods for potentially immunogenic material and structural changes, and with the help of biomechanical testing for mechanical properties. Native porcine and bovine pericardium served as control.

The protocols I to III could not reach a sufficient removal of deoxyribonucleic acids (DNA). Although Protocol IV could reach a sufficient removal of DNA, it could not reach a sufficient removal of galactose- $\alpha$ -1,3-galactose ( $\alpha$ -Gal). Only protocol V could reach on porcine pericardium a sufficient removal of DNA as well as  $\alpha$ -Gal. Applied on bovine pericardium Protocol V could reach a sufficient reduction of DNA, however,  $\alpha$ -Gal was still detectable. Therefore, only Protocol V applied on porcine pericardium fulfil the criteria for a successfully decellularization.

The samples which were decellularized with protocol I, II and V showed a well-maintained collagen network. The samples which were decellularized with Protocol III and IV showed a swollen structure of the extracellular matrix. It remains an open question how much this result reduces the potential for reseeding.

None of the applied Protocols led to a significant change in the elastic modulus, despite the proven loss of glycosaminoglycans (GAG) through almost all protocols. Therefore, the loss of GAG does not necessarily correlate with a negative impact on the elastic behaviour of the pericardium.

Bovine pericardium showed clearly higher modulus of elasticity than porcine pericardium. Further studies are necessary to decide whether this result may translate into the superiority of one over the other type of pericardium.

In summary, the highest reduction of antigens whilst best maintaining of structural and mechanical properties, was achieved in pericardium treated with Protocol V. Follow-up studies are necessary, to analyse if further criteria are fulfilled, before the decellularized pericardium could be used as a scaffold for tissue engineered heart valves. This includes that the tissue must be free of endotoxins which would inhibit a reseeding with cells and that the tissue must withstand physiological flow conditions.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>1   EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
1.1   Herzklappenerkrankungen.....	8
1.1.1   Epidemiologie und Klinik.....	8
1.1.2   Therapieoptionen .....	8
1.2   Tissue Engineering von Herzklappen.....	10
1.2.1   Theoretischer Hintergrund .....	10
1.2.2   Stand der Forschung.....	11
1.3   Perikard als Ausgangsgewebe .....	12
1.4   Dezellularisierung als Methode .....	12
1.5   Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	14
<b>2   Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1   Präparation des Perikards .....	15
2.2   Dezellularisierung.....	15
2.2.1   Protokoll I (Borschel-Protokoll) .....	15
2.2.2   Protokoll II (Lichtenberg-Protokoll).....	16
2.2.3   Protokoll III (Cebotari-Protokoll) .....	16
2.2.4   Protokoll IV (Rieder-Protokoll).....	16
2.2.5   Protokoll V (Tedder-Protokoll).....	17
2.3   Histologie.....	17
2.3.1   Paraffineinbettung .....	17
2.3.2   Herstellung von Paraffinschnitten.....	18
2.3.3   Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	18
2.3.4   DAPI-Färbung.....	18
2.3.5   Movat's Pentachrome Färbung .....	19
2.3.6   Direktrotfärbung (picro sirius red).....	19
2.3.7   Kombinierte Färbung mit Direktrot (picro sirius red) und Fast Green und Spektrophotometrie .....	20
2.4   Molekularbiologie .....	21
2.4.1   DNA-Quantifizierung .....	21
2.4.2   GAG-Quantifizierung .....	21
2.4.3   Western Blot Analyse .....	22
2.5   Biomechanische Testung .....	23
2.5.1   Probenaufarbeitung .....	23
2.5.2   Messung .....	23
2.5.3   Auswertung.....	24

---

2.6   Statistische Auswertung .....	25
2.7   Materialliste .....	26
2.8   Geräteliste .....	28
<b>3   Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
3.1   Histologische Auswertung.....	29
3.1.1   HE-Färbung.....	29
3.1.2   DAPI-Färbung.....	32
3.1.3   Movat's Pentachrome Färbung .....	35
3.1.4   Picro Sirius Red Färbung .....	37
3.1.5   PSR/FG-Färbung und relativer Kollagengehalt .....	40
3.2   Molekularbiologische Auswertung.....	44
3.2.1   DNA-Gehalt .....	44
3.2.2   GAG-Gehalt .....	47
3.2.3   Quantitative Protein-Bestimmung mittels Western Blot.....	49
3.3   Biomechanische Eigenschaften .....	56
3.3.1   Elastische Energiedichte .....	56
3.3.2   Elastizitätsmodul .....	59
3.3.3   Gewebedicke .....	62
<b>4   Diskussion.....</b>	<b>66</b>
4.1   Diskussion der Methoden .....	66
4.1.1   Präparation .....	66
4.1.2   Dezellularisierung .....	66
4.1.3   Proteinanalysen .....	67
4.1.4   Biomechanische Testung .....	67
4.2   Diskussion der Ergebnisse.....	68
4.2.1   Antigenreduktion .....	68
4.2.2   Erhalt der strukturellen ECM-Eigenschaften .....	70
4.2.3   Erhalt der mechanischen Integrität.....	71
4.3   Eignung als Matrix für tissue engineerte Herzklappen.....	72
4.4   Schlussfolgerungen.....	73
<b>5   Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b><math>\alpha</math>-Gal</b>	Galactose-alpha-1,3-Galactose
<b>Aqua dest.</b>	Destilliertes Wasser
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>d</b>	Tag
<b>DAPI</b>	Diamidinphenylindol
<b>DCA</b>	Natriumdeoxycholsäure
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ECM</b>	Extrazellulärmatrix
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykane
<b>h</b>	Stunde
<b>IGEPAL</b>	Octylphenoxypolyethoxyethanol
<b>Min.</b>	Minute
<b>PBA</b>	Poly lactide
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PGA</b>	Polyglycolide
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>RIPA</b>	Radioimmunoprecipitation Assay Puffer
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat/Natriumlaurylsulfat
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>TBST</b>	Trisaminomethan-gepufferte Salzlösung mit Polysorbat 20

---

## TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Agenzien und Methoden zur Dezellularisierung.....	13
Tabelle 2 - Protokoll I.....	16
Tabelle 3 - Protokoll IV.....	17
Tabelle 4 - Protokoll V.....	17
Tabelle 5 – DNA-Gehalt in bovinem Perikard.....	45
Tabelle 6 – DNA-Gehalt in porcinem Perikard.....	46
Tabelle 7 - GAG-Gehalt in bovinem Perikard.....	48
Tabelle 8 - GAG-Gehalt in porcinem Perikard.....	49
Tabelle 9 - Energiedichte in bovinem Perikard.....	57
Tabelle 10- Energiedichte in porcinem Perikard.....	58
Tabelle 11- E- Modul des bovinen Perikards.....	60
Tabelle 12 - E- Modul des porcinen Perikards.....	61
Tabelle 13 - Dicke des bovinen Perikards.....	63
Tabelle 14 - Dicke des porcinen Perikards.....	64

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Bovines Perikard HE-Färbung (40x Vergrößerung).....	30
Abbildung 2 – Porcines Perikard HE-Färbung (40x Vergrößerung).....	31
Abbildung 3 - Bovines Perikard DAPI-Färbung (40x Vergrößerung).....	33
Abbildung 4 – Porcines Perikard DAPI-Färbung (40x Vergrößerung).....	34
Abbildung 5 - Bovines Perikard Movat-Färbung (40x Vergrößerung).....	35
Abbildung 6 - Porcines Perikard Movat-Färbung (40x Vergrößerung).....	36
Abbildung 7 - Bovines Perikard Picro Sirius Red Färbung (40x Vergrößerung).....	38
Abbildung 8 - Porcines Perikard Picro Sirius Red Färbung (40x Vergrößerung).....	39
Abbildung 9 - Bovines Perikard Sirius Red-Fast Green Färbung (40x Vergrößerung).....	42
Abbildung 10 - Porcines Perikard Sirius Red-Fast Green-Färbung (40x Vergrößerung) ..	43
Abbildung 11 - Western Blot $\alpha$ -Gal in bovinem Perikard.....	50
Abbildung 12 - Western Blot $\alpha$ -Gal in porcinem Perikard.....	51
Abbildung 13 - Western Blot Osteopontin in bovinem Perikard.....	52
Abbildung 14 - Western Blot Osteopontin in porcinem Perikard.....	52
Abbildung 15 - Western Blot Kollagen Typ 1 in RP (RIPA-Lysate).....	53

Abbildung 16 - Western Blot Kollagen Typ 1 in RP (Urea-Lysate).....	54
Abbildung 17 - Western Blot Kollagen Typ 1 in SP (RIPA-Lysate).....	55
Abbildung 18 - Western Blot Kollagen Typ 1 in SP (Urea-Lysate).....	56

## Diagrammverzeichnis

Diagramm 1 – Spektrophotometrie: Relativer Kollagengehalt bovines vs. porcines Perikard.....	40
Diagramm 2- Relativer Kollagengehalt in bovinem Perikard (kolorimetrische Bestimmung) .....	41
Diagramm 3 - Relativer Kollagengehalt in porcinem Perikard (kolorimetrische Bestimmung) .....	41
Diagramm 4 – Mittlerer DNA-Gehalt in bovinem und porcinem Perikard .....	44
Diagramm 5 - DNA-Gehalt in bovinem Perikard .....	45
Diagramm 6 - DNA-Gehalt in porcinem Perikard .....	46
Diagramm 7 – Mittlerer GAG-Gehalt in bovinem und porcinem Perikard .....	47
Diagramm 8 - GAG-Gehalt in bovinem Perikard .....	48
Diagramm 9 - GAG-Gehalt in porcinem Perikard .....	49
Diagramm 10 - Relativer $\alpha$ -Gal-Gehalt in bovinem Perikard .....	51
Diagramm 11 - Relativer $\alpha$ -Gal-Gehalt in porcinem Perikard .....	52
Diagramm 12 - Kollagen Typ 1: Relativer Gehalt in RP (RIPA-Lysate) .....	53
Diagramm 13 - Kollagen Typ 1 Relativer Gehalt (Urea-Lysate).....	54
Diagramm 14 - Kollagen Typ 1: Relativer Gehalt in SP (RIPA-Lysate).....	55
Diagramm 15 - Kollagen Typ 1: Relativer Gehalt in SP (Urea-Lysate).....	56
Diagramm 16 - Energiedichte in bovinem Perikard.....	57
Diagramm 17 - Energiedichte in porcinem Perikard.....	58
Diagramm 18 – Mittlere Energiedichte in bovinem und porcinem Perikard .....	59
Diagramm 19 – E-Modul des bovinen Perikards .....	60
Diagramm 20- E-Modul des porcinen Perikards.....	61
Diagramm 21 – Mittlere Werte des Elastizitätsmoduls des bovinen vs. des porcinen Perikards .....	62
Diagramm 22 - Dicke des bovinen Perikards.....	63
Diagramm 23 - Dicke des porcinen Perikards.....	64
Diagramm 24 – Mittlere Werte der Dicke des bovinen vs. des porcinen Perikards .....	65

---

# 1 | EINLEITUNG

## 1.1 | Herzklappenerkrankungen

### 1.1.1 | Epidemiologie und Klinik

Im Jahre 2015 wurden in Deutschland über 32.000 Herzklappenoperation vorgenommen, davon über 9000 katheterbasierte Eingriffe. Seit dem Jahre 2005 steigt die stationäre Morbiditätsziffer der Herzklappenerkrankungen parallel zur verlängerten Lebenserwartung und der verbesserten diagnostischen Möglichkeiten kontinuierlich an. Innerhalb der operativ behandelten Herzklappenerkrankungen ist die Aortenklappenstenose mit Abstand die am häufigsten operierte Form der Herzklappenerkrankung, gefolgt von der Mitralklappeninsuffizienz. (DHB, 2016) Sie entstehen am häufigsten altersbedingt durch Degeneration und Kalzifizierung. (Herold, 2011) Dabei liegt der Großteil der Erkrankten in der Altersgruppe der über 60-jährigen. (DHB, 2016) Wesentlich seltener sind Erkrankungen der Trikuspidal- oder Pulmonalklappe. Diese treten am häufigsten im Rahmen kongenitaler Herzanomalien auf. Je nach Art des Klappenitiums entsteht im Herzen eine Volumen- oder eine Druckbelastung. Klinisch äußert sich dies in Symptomen einer Herzinsuffizienz. Die Entscheidung zu einer zurückhaltenden konservativen oder einer operativen bzw. interventionellen Behandlung hängt vom Ausmaß der Klappenschädigung und der klinischen Symptomatik ab. (Herold, 2011)

### 1.1.2 | Therapieoptionen

Herzklappenfehler können funktionell nur durch einen chirurgischen oder transkutanen prothetischen Herzklappenersatz bzw. eine Rekonstruktion behandelt werden. Diese Form der Therapie geht mit einer signifikant erhöhten Überlebensrate und einer verbesserten Lebensqualität einher. (Kheradvar A., 2014) Bis heute stehen jedoch keine Klappenprothesen zur Verfügung, die mit natürlichen Klappen bezüglich Haltbarkeit und Funktion vergleichbar wären. (Herold, 2011) Eine ideale Herzklappenprothese sollte bestimmte Anforderungen erfüllen. Sie darf keine Thrombogenität oder erhöhte Infektanfälligkeit aufweisen, keine Hämolyse durch Klappenbestandteile bewirken und sollte unbegrenzt haltbar sein. (Goecke T., 2015)

Bei den aktuell eingesetzten Herzklappenprothesen wird zwischen mechanischen und bioprothetischen Herzklappen unterschieden. Die erste mechanische Herzklappe wurde erstmals 1952 von C.A. Hufnagel implantiert. (Hufnagel C, 1958) Seitdem werden mechanische Klappen in verschiedenen Formen, Größen und Materialien angeboten und stetig

---

weiterentwickelt. Die Hauptansätze in der Weiterentwicklung von mechanischen Herzklappen liegen in der Optimierung des Scharnierdesigns, der Verbesserung ihrer hämodynamischen Eigenschaften, sowie in der Entwicklung neuer antithrombogener Oberflächenbeschichtungen. Als Material für die beweglichen Teile der mechanischen Herzklappen dient i.d.R. pyrolytisches Carbon. (Kheradvar A., 2014) Der Hauptvorteil mechanischer Herzklappen besteht in der Abwesenheit degenerativer Veränderungen und in der hohen mechanischen Lebensdauer. Wesentliche Nachteile sind die unphysiologischen Flusseigenschaften und das somit erhöhte Thrombembolierisiko. Dies macht eine lebenslängliche Antikoagulation unabdingbar. (Geißler H. J., 2009) Diese ist wiederum mit dem Risiko gefährlicher Blutungskomplikationen verbunden und macht eine zuverlässige INR-Selbstbestimmung notwendig. (Herold, 2011) In Angesicht der genannten Nachteile und der aktuellen Fortschritte im Bereich bioprothetischer Herzklappen, insbesondere neuerer Transkatheterklappen, bleiben mechanische Herzklappen weiterhin primär jüngeren Patienten vorbehalten. (Kheradvar A., 2014)

Der Einsatz biologischer Klappen ist seit über vierzig Jahren klinischer Alltag. (Ionescu M.I., 1984) Sie haben eine niedrige Thrombogenität, sodass auf eine langfristige Antikoagulation verzichtet werden kann. Zudem verfügen sie verglichen mit mechanischen Klappen über eine physiologischere Hämodynamik. (Kheradvar A., 2014) Aktuell eingesetzte biologische Herzklappen sind xenogener oder allogener Natur.

Bioprosthetische Klappen auf xenogener Basis bestehen aus chemisch fixierten porcinen Klappensegeln, bovinem oder porcinem Perikard. Die chemische Fixierung erfolgt in der Regel mit Glutaraldehyd. (Kheradvar A., 2014) (Hülsmann J., 2012) Es reduziert die Immunogenität durch Kreuzvernetzung von Proteinen, stabilisiert die Matrix und macht sie resistenter gegenüber Enzymen. Außerdem ist es ein effektives Sterilisierungs- und Konservierungsmittel. (Collatusso C., 2011) Allerdings wirken Aldehydresiduen in der Matrix zytotoxisch, was eine Zellinfiltration unmöglich macht. Zudem kann die Fixierung mit Glutaraldehyd die Immunogenität nicht vollständig aufheben, was eine chronische Immunreaktion verursachen kann. (Vinci M. C., 2013) Gemeinsam mit der Anfälligkeit glutaraldehydfixierter Klappen für Kalzifizierungen, führt dies zu einer kurzen Haltbarkeit von nur ca. 10-15 Jahren. (Kheradvar A., 2014) Um mehrfache Operationen zu vermeiden sind xenogene Herzklappen daher hauptsächlich älteren Patienten vorbehalten. Allerdings wird die Anwendung biologischer Prothesen in der jüngsten Vergangenheit zunehmend liberal gehandhabt, sodass aktuell z.B. im Falle des Aortenklappenersatzes Patienten bereits mit

---

einem Alter von 60 oder höher primär die Empfehlung zur Wahl einer biologischen Prothese erhalten.

Homografts sind humane Leichenklappen welche nach Explantation antibiotisch behandelt und zur Lagerung kryokonserviert werden. Trotz ihrer im Vergleich mit xenogenen Klappen immunologisch besseren Verträglichkeit weisen auch diese Klappen schnelle Degenerationserscheinungen auf. (Dohmen P. M., 2011) Ein zusätzlicher Nachteil ist die Abhängigkeit von Spendermaterial und die somit limitierte Verfügbarkeit. Homografts spielen daher bei der Behandlung von Herzklappenfehlern eine untergeordnete Rolle. (Steinhoff G., 2000) Sie werden hauptsächlich im Rahmen von Ross-Operationen eingesetzt um eine in die Aortenposition verpflanzte, patienteneigene Pulmonalklappe (sog. Autograft) zu ersetzen. (Dohmen P. M., 2011)

Alle aktuell eingesetzten Herzklappenprothesen haben den gemeinsamen Nachteil des fehlenden Wachstums- und Regenerationspotentials. Dies führt insbesondere bei pädiatrischen Patienten zu wiederholten Operationen und bei älteren Patienten zu schnellen Degenerationserscheinungen. Eine vielversprechende Alternative bietet das Konzept des Tissue Engineering (dt.: Gewebezüchtung).

## 1.2 | Tissue Engineering von Herzklappen

### 1.2.1 | Theoretischer Hintergrund

Die gängigste Definition des Tissue Engineering ist jene, die 1993 von Langer und Vacanti etabliert wurde: „*Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function.*“ (Langer R., 1993) Das Herzklappen Tissue engineering verfolgt somit das Ziel der Herstellung von Prothesen, welche Form und Funktion gesunder nativer Herzklappen imitieren und die Fähigkeit zum Wachstum und zur Regeneration besitzen. Das gängigste Paradigma des Tissue Engineering impliziert, dass zunächst ein Gerüst entwickelt wird. Dieses wird mit Zellen besiedelt wodurch ein funktionsfähiges Gewebe entsteht, welches implantiert werden kann. (Rabkin E., 2002) In einem alternativen Ansatz, dem sogenannten *Guided Tissue Regeneration*, wird das Gerüst zellfrei implantiert, in Erwartung einer *in vivo* Besiedlung mit körpereigenen Stammzellen aus dem Blutstrom. (Goecke T., 2015) (Akhyari P., 2011)

### 1.2.2 | Stand der Forschung

Ein erstes vollständiges Konzept zum Tissue Engineering von Herzklappen wurde 1995 von Shinoka et al. in Boston vorgestellt. (Shinoka T., 1995) Die Grundidee war die Herstellung eines Grundgerüsts aus synthetischem Material welches *in vitro* mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelt wird. Dieses Gerüst sollte *in vivo* schrittweise degradiert und resorbiert werden während die Zellen eine eigene ECM bilden und so ein neues Gewebe schaffen. Als Ausgangsmaterial für solch ein synthetisches Gerüst werden biokompatible und resorbierbare Stoffe wie Polylactide (PLA) und Polyglycolide (PGA) eingesetzt. Solche Gerüste bieten den Vorteil der breiten Verfügbarkeit und der auswählbaren Materialstruktur und Eigenschaften. Dem Konzept des synthetischen Gerüsts stellen sich mehrere Herausforderungen, wie die Regulation der Zelladhäsion und das Verhindern einer zu schnellen oder einer unvollständigen Resorption des Polymergerüsts *in vivo*. (Mendelson K., 2006) (Neuenschwander S., 2004) (Kheredvar A., 2014) (Steinhoff G., 2000)

Ein alternativer Ansatz welcher die Probleme der noch unzureichend befriedigenden Polymercharakteristika umgeht, ist die Verwendung eines biologischen Gerüsts. Es besteht entweder aus natürlichen reinen ECM-Komponenten wie Kollagen und Fibrin oder aus einem geeigneten biologischen Gewebe welches zuvor dezellularisiert wurde. Reine ECM-Komponenten haben wesentliche Schwächen, wie die Tendenz zur Schrumpfung und der Entstehung von Zellnekrosen und –apoptosen bei der Besiedlung. Daher widmen sich viele Arbeitsgruppen natürlichem biologischem Gewebe, welches dezellularisiert wird, um es als Matrix für tissue-engineerte Herzklappen zu verwenden. (Mendelson K., 2006) Der Fokus lag dabei bisher in der Verwendung von Herzklappen xenogener oder allogener Natur als Ausgangsmaterial. Sie bieten natürliche strukturelle und mechanische Eigenschaften, die denen nativer gesunder Herzklappen nahekommen. Zudem beinhalten sie biologische Informationen wie z.B. Wachstumsfaktoren, die eine Rebesiedlung mit Zellen potentiell möglich machen. Ihre mechanischen Eigenschaften erfüllen das unabdingbare Kriterium der sofortigen Belastbarkeit und Funktionalität ab dem Zeitpunkt der Implantation. Gleichzeitig sind sie potentiell resorbierbar, wobei dies nicht auf Degradationsprozesse beruht wie es bei künstlichen Polymeren der Fall ist, sondern viel mehr auf metabolische Prozesse. (Neuenschwander S., 2004) (Steinhoff G., 2000) Bisher lag der Fokus bei der Herstellung tissue-engineerter Herzklappen auf die Anwendung in der pulmonalen Position. Nur wenige Forschungsgruppen haben die Versuche auf die aortale Position übertragen. (Akhyari P., 2010) (Neumann A., 2013) Da die seit Jahren klinisch eingesetzten

---

Herzklappen aus chemisch fixiertem Perikard gute Ergebnisse in der aortalen Position gezeigt haben, (Ionescu M.I., 1984) widmen sich einige Arbeitsgruppen diesem Gewebe als Ausgangsmaterial für tissue-engineerte Herzklappen. (Tedder M. E., 2009) (Hülsmann J., 2012) (Dohmen P. M., 2014)

### **1.3 | Perikard als Ausgangsgewebe**

Perikard ist ein bindegewebiger Sack, welcher das Herz umhüllt. Es besteht aus einer serösen Schicht welche dem Herzen anliegt, dem sog. Epikard, und dem fibrösen Perikard. (Schünke M., 2005) Die Untersuchung des fibrösen Perikards verschiedener Spezies konnte zeigen, dass es sich um ein Bindegewebe handelt, welches hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht. Weitere Bestandteile sind Elastin und Glykosaminoglykane sowie bindegewebsproduzierende Zellen. (Mendoza-Novelo B., 2011) Die erste Herzklappenprothese aus bovinem Perikard wurde 1971 von Ionescu et al. konzipiert und erfolgreich implantiert. (Ionescu M.I., 1984) Seitdem werden chemisch fixierte Klappen aus Perikard neben ebenso chemisch fixierten porcinen Aortenklappen routinemäßig in der Klinik eingesetzt. (Kheradvar A., 2014) Klappen aus bovinem Perikard konnten in mehreren Studien bessere hämodynamische Eigenschaften in der Aortenposition vorweisen als porcine Aortenklappen. Sie haben größere effektive Öffnungsflächen und somit geringere Druckdifferenzen als vergleichbare Schweineklappen. (Antunes, 2014) In den neueren Transkatheterklappen wird zunehmend auch porcines Perikard eingesetzt. (Kheradvar A., 2014) Sowohl bovines als auch porcines Perikard sind durch gezielte Tierzucht auch in großer Stückzahl verfügbar. Seit kurzem hat dieses Gewebe als Ausgangsmaterial für tissue engineerte Herzklappen die Aufmerksamkeit auf sich gezogen. (Tedder M. E., 2009) Es erfüllt mehrere Kriterien die für den Einsatz als Gerüst erforderlich sind. Dazu gehören adäquate mechanische Eigenschaften, welche weitgehend erforscht wurden. Eine Herausforderung stellt die Entfernung von xenogenen Komponenten dar, welche eine Rebesiedlung mit autologen Zellen verhindern und immunologische Reaktionen beim Empfänger auslösen könnten. (Griffiths L. G., 2008) Zur Lösung dieses Problems wurde das Konzept der Dezellularisierung entworfen. (Gilbert T. W., 2006) (Courtman D. W., 1994)

### **1.4 | Dezellularisierung als Methode**

Die Matrix welche den Zellen als Leitstruktur dient und der späteren Bioprothese ihre dreidimensionale Struktur verleiht, muss biokompatibel und frei von zytotoxischen, prokalkifizierenden oder immunogenen Elementen sein. (Teebken O. E., 2007) Mindestkrite-

rien, die erfüllt sein müssen um eine Dezellularisierung als ausreichend bezeichnen zu können, sind ein DNA-Gehalt von weniger als 50 ng/mg Trockengewicht sowie ein fehlender Nachweis von sichtbarem nuklearem Material in der HE- oder DAPI-Färbung. (Crapo P. M., 2011) Das alleine ist jedoch nicht ausreichend, um von xenogenfreiem Gewebe sprechen zu können. Die Entfernung von Xenogenen wie dem  $\alpha$ -Gal-Epitop sollte bei der Dezellularisierung ebenfalls im Fokus stehen, da gezeigt werden konnte, dass diesem Antigen eine besondere Rolle bei der Auslösung von Immunreaktionen zugeschrieben wird. (Kasimir M.-T., 2005) (Badylak S. F., 2008) Meistens wird bei der Erstellung eines Dezellularisierungsverfahrens eine Kombination aus chemischen und physikalischen Elementen gewählt. Hierzu zählen der Einsatz hypo- und hypertonen Lösungen, Detergenzien, Alkohole, Enzyme und Chelate. Zur Minimierung der Kontamination mit Mikroorganismen können Biozide eingesetzt werden. Um die Exposition des Gewebes mit der Dezellularisierungslösung zu maximieren, werden physikalische Methoden angewendet. (Gilbert T. W., 2006) Eine Zusammenfassung von häufig eingesetzten Elementen bietet Tabelle 1.

**Tabelle 1 - Agenzien und Methoden zur Dezellularisierung**

<b>Osmose</b>	Hyper- und hypotone Lösungen
<b>Ionische Detergenzien</b>	Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumdeoxychololat (DCA)
<b>Nicht-ionische Detergenzien</b>	Triton X-100
<b>Chelate</b>	EDTA
<b>Enzyme</b>	Trypsin, DNase, RNase
<b>Biozide</b>	Antibiotika, Natriumazid
<b>Physikalische Methoden</b>	Mechanische Agitation (Schütteln)

Die Effektivität einer Dezellularisierungsmethode hängt von der Zellularität des Gewebes, der Gewebedicke und -dichte, sowie den eingesetzten Dezellularisierungsmitteln ab. Neben einer ausreichenden Entfernung von immunogenem Material sollte die Schädigung der mechanischen Integrität und die Zusammensetzung der ECM minimal gehalten werden. Eine ausreichende Antigenreduzierung und der Erhalt der strukturellen und mechanischen Eigenschaften des nativen Gewebes: dies zu erreichen ist das Ziel eines optimalen Dezellularisierungsprotokolls. (Keane T. J., 2015) (Courtman D. W., 1994) (Pagoulatou E., 2012) (Keane T. J., 2015)

## 1.5 | Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit setzt sich die Evaluation verschiedener Dezellularisierungsprotokolle zum Ziel. Hierbei werden fünf Protokolle verwendet, welche bereits in der Literatur beschrieben worden sind. (Akhyari P., 2010), (Lichtenberg A., 2006), (Cebotari S., 2006), (Rieder E., 2005), (Tedder M. E., 2009). Die Analysen werden an bovinem und porcinem Perikard angewendet. Als Kontrollgruppe dient das native Perikard der jeweiligen Spezies.

Die Untersuchung des Perikards vor und nach Dezellularisierung erfolgt mittels histologischer und molekularbiologischer Verfahren sowie biomechanischer Testungen. Mit Hilfe dieser Methoden wird gezeigt wie effektiv die einzelnen Dezellularisierungsprotokolle das native porcine und bovine Perikard von immunogenem Material befreien. Zusätzlich wird untersucht, wie stark die Dezellularisierungsverfahren die strukturellen Eigenschaften der Extrazellulärmatrix und die mechanischen Eigenschaften des nativen Perikards beeinträchtigen.

## **2 | Material und Methoden**

### **2.1 | Präparation des Perikards**

Die verwendeten Herzbeutel werden aus Rinder- und Schweineherzen präpariert, die vom Schlachtbetrieb Willy Siemes & Sohn in Viersen abgeholt werden. Die frischen Herzen werden in eine verschließbare und mit Brucheis gefüllte Transportbox gegeben. Nach dem Transport wird rasch mit der Präparation begonnen. Das Perikard wird auf eine sterile Unterlage gelegt. Die Präparation erfolgt mit sterilem Instrumentarium. Die Ablösung des Perikards vom Herzen erfolgt durch einen ersten Schnitt von der Mitte der Corona cordis (zwischen Aorta und Truncus pulmonalis) bis zur Apex cordis, und einem zweiten horizontalen Schnitt entlang der Perikardumschlagstellen an den großen Gefäßen. Das aufgeklappte Perikard wird von überschüssigem Fett befreit, ohne dabei das Pericardium fibrosum zu beschädigen. Es werden 3 x 4 cm große longitudinale Perikardstreifen mit einem Skalpell herausgeschnitten, welche anschließend für eine Stunde in einer antiseptischen PBS-Lösung mit 10 % Betaisadon-Lösung inkubiert werden. Danach werden die Streifen für fünf Minuten in eine sterile PBS-Lösung getaucht, um daraufhin für eine Stunde in einer PBS-Lösung mit 2% Penicillin/Streptomycin-Lösung gewaschen zu werden. Anschließend werden die Perikardstreifen unmittelbar den entsprechenden Analysen zugeführt.

### **2.2 | Dezellularisierung**

Die Dezellularisierung der Perikardstreifen erfolgt in autoklavierten 250 ml Vierkant-Laborglasflaschen und auf einem Schüttler, welcher mit 220 Umdrehungen pro Minute betrieben wurde. In jede Kantflasche werden jeweils 2 Perikardstreifen und 150 ml Lösung gegeben.

#### **2.2.1 | Protokoll I (Borschel-Protokoll)**

Dieses Protokoll basiert auf einer Methode von Borschel et al. welche zur Dezellularisierung von Skelettmuskulatur angewendet wurde (Borschel G.H., 2004) und von Akhyari et al. zur Dezellularisierung von ovinen Aortenklappen eingesetzt wurde. (Akhyari P., 2010) Alle Schritte erfolgen bei Raumtemperatur.

Tabelle 2 - Protokoll I

Dauer	Reagenz
3 d	80% Glycerol 0,9% NaCl 0,05% NaN <sub>3</sub> 25mM EDTA
3 d	4,2 % DCA 0,05% NaN <sub>3</sub>
2 d	80% Glycerol 0,9% NaCl 0,05% NaN <sub>3</sub> 25mM EDTA
2 d	1% SDS 0,05% NaN <sub>3</sub>
2 d	3% Triton X-100 0,05% NaN <sub>3</sub>
2 d	1% SDS 0,05% NaN <sub>3</sub>
2 d	0,05% NaN <sub>3</sub>
3 Stunden	2% Penicillin/Streptomycin in PBS-Lösung

### 2.2.2 | Protokoll II (Lichtenberg-Protokoll)

Diese Methode wurde von Lichtenberg et al. zur Dezellularisierung von ovinen Pulmonalklappen erstellt. (Lichtenberg A., 2006) Alle Schritte erfolgen bei Raumtemperatur. Das Perikard wird 48 Stunden in einer Detergenzlösung aus 0,5% SDS und 0,5% DCA inkubiert. Alle 12 Stunden erfolgt ein Lösungswechsel. Anschließend werden die Perikardstreifen 24 Stunden in Aqua dest. und danach 72 Stunden bei täglichem Lösungswechsel in einer sterilen PBS-Lösung gewaschen.

### 2.2.3 | Protokoll III (Cebotari-Protokoll)

Dieses Protokoll basiert auf einer Methode von Cebotari et al., welches zur Dezellularisierung von humanen Pulmonalklappen erstellt wurde. (Cebotari S., 2006) Die Perikardstreifen werden 24 Stunden bei 37°C in einer PBS-Lösung mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA inkubiert. Anschließend erfolgt ein 7-tägiger Waschvorgang in steriler PBS-Lösung bei Raumtemperatur.

### 2.2.4 | Protokoll IV (Rieder-Protokoll)

Dieses Protokoll basiert auf einer Methode die von Rieder et al. beschrieben und zur Dezellularisierung von porcinen und humanen Pulmonalklappen verwendet wurde. (Rieder E., 2005)

Tabelle 3 - Protokoll IV

Dauer	Reagenz	Temperatur
2 d	0,05% Triton X-100 0,05% DCA 0,05% IGEPAL	4°C
1 d	100µg/ml RNase 150IU/ml DNase 50mmol MgCl <sub>2</sub> in PBS-Lösung	37°C
12 d	PBS-Lösung	RT
3 d	2 % Penicillin/Streptomycin in PBS-Lösung	

### 2.2.5 | Protokoll V (Tedder-Protokoll)

Dieses Verfahren basiert auf einer Methode welche von Tedder et al. zur Dezellularisierung von porcinem Perikard entwickelt wurde. (Tedder M. E., 2009)

Tabelle 4 - Protokoll V

Dauer	Reagenz	Temperatur
1 d	Aqua dest.	4°C
6 d	0,25% DCA 0,15% Triton X-100 0,1% EDTA 0,02% NaN <sub>3</sub> in 50mM HCl-Puffer (pH 7,8), Lösungswechsel nach 3 Ta- gen	RT
30min	Aqua dest. 70% Ethanol	
1 d	360mU DNase 360mU RNase in PBS-Lösung	37°C
30min	Aqua dest.	RT
6 d	40mU/ml Elastase, 1mM CaCl <sub>2</sub> 0,02% NaN <sub>3</sub> in 50mM Tris- Puffer (pH 8) Lösungswechsel nach 3 Tagen	37 °C
2 d	Aqua dest.	RT

## 2.3 | Histologie

### 2.3.1 | Paraffineinbettung

Zur histologischen Charakterisierung des Perikards werden die zu untersuchenden Proben in Paraffin eingebettet. Zuvor werden hierfür native und dezellularisierte Perikardstreifen für mindestens 24 Stunden in 4 % Formaldehydlösung fixiert. Anschließend werden aus den ursprünglichen Streifen, dünne 0,5 x 4 cm große Streifen geschnitten. Um eine erleichterte Positionierung in den Einbettkassetten zu ermöglichen, werden aus diesen Streifen Röllchen geformt. Um ein Aufrollen zu verhindern wird um jedes Perikardröll-

---

chen Filterpapier gewickelt, welches zuvor in Aqua dest. getränkt wurde. Anschließend werden die Perikardröllchen jeweils eine Stunde in 70%, 80%, 96% und 100% Ethanol entwässert. Danach wird das Gewebe zweimal mit 100% Xylol durchtränkt, um danach zwei Stunden lang bei 56°C in Paraffin eingebettet zu werden. Anschließend wird das Filterpapier abgelöst. Es wird jeweils ein Röllchen mittig und senkrecht, in eine mit flüssigem Paraffin (1% DMSO) gefüllte Einbettkassette positioniert. Das Abkühlen der Paraffinblöcke erfolgt im Kühlschrank bei 4°C.

### **2.3.2 | Herstellung von Paraffinschnitten**

Aus den Paraffinblöcken werden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 5 µm starke Schnitte angefertigt. Die Schnitte werden anschließend in einem Wasserbad gestreckt und danach auf beschriftete Objektträger aufgebracht. Diese werden über Nacht auf einer Heizplatte bei 56°C getrocknet. Bevor die Schnitte gefärbt werden können, müssen diese dreimal für je zehn Minuten in Xylol entparaffinisiert und für jeweils fünf Minuten in 100%, 96% und 70% Ethanol, sowie abschließend für eine Minute in Aqua dest. rehydriert werden.

### **2.3.3 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Mit Hilfe dieser Färbung kann eine Aussage über den Gehalt an Zellkernen sowie über die Beschaffenheit der Extrazellulärmatrix getroffen werden. Zellkerne werden blau dargestellt. Zytoplasma und Extrazellulärmatrix erscheinen rosa. Die entparaffinisierten und rehydrierten Schnitte werden nach dem folgenden Protokoll gefärbt:

- Gill-Hämatoxylin, 1 Minute
- Aqua dest., 1 Minute
- 5 % Eisessigwasser, 1 Minute
- Aqua dest., 3 x 1 Minute
- 70 % Ethanol, 1 Minute
- Eosin alkoholisch, 1 Minute

Anschließend werden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%, 96% und 100% Ethanol für je 1 Minute entwässert. Nach 2 x 1 Minute in Xylol, werden die Schnitte an der Luft getrocknet und eingedeckt.

### **2.3.4 | DAPI-Färbung**

Diamidinphenylindol ist ein Fluoreszenzfarbstoff der zur Darstellung von DNA eingesetzt wird. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI mit blauer Farbe. Nach der Entparaffinisierung und Rehydrierung werden die zu färbenden Schnitte mit ei-

---

ner DAPI-haltigen Lösung (Vector laboratories) eingedeckt. Um ein Ausbleichen zu verhindern wird die Inkubation lichtgeschützt durchgeführt.

### 2.3.5 | Movat's Pentachrome Färbung

Die Pentachrom Färbung nach Movat ermöglicht eine spezifische Darstellung der einzelnen Komponenten der Extrazellulärmatrix. Kollagenfasern werden gelb, elastische Fasern rot und Glykosaminoglykane hellblau dargestellt. Zellkerne erscheinen rotbraun. Die Paraffinschnitte werden nach dem folgenden Protokoll gefärbt:

- Alcianblau, 10 Minuten
- Tropfendes Leitungswasser, 5 Minuten
- Alkalisches Ethanol, 60 Minuten
- Tropfendes Leitungswasser, 10 Minuten
- Aqua dest., 1 Minute
- Weigerts Eisenhämatoxylin, 10 Minuten
- Aqua dest., 1 Minute
- Tropfendes Leitungswasser, 15 Minuten
- Brillant-Crocein-Säurefuchsin, 15 Minuten
- 0,5% Essigsäure, 1 Minute
- 5% Phosphorwolframsäure, 20 Minuten
- 0,5% Essigsäure, 2 Minuten
- 100% Ethanol, 3 x 5 Minuten
- Saffron du Gatinais, 60 Minuten

Anschließend werden die Schnitte dreimal kurz in 100% Ethanol gespült und eine Minute in Xylol getaucht. Nach der Trocknung werden die Schnitte eingedeckt.

### 2.3.6 | Direktrotfärbung (picro sirius red)

Diese Methode basiert auf der Anlagerung des stark anionischen Farbstoffes Direktrot (in engl. Literatur sirius red) durch seine Schwefelsäuregruppen an basische Seitenketten des Kollagens. (Sweat F., 1964) Durch Darstellung einzelner Kollagenfasern unter polarisierendem Licht ermöglicht diese Färbung eine genauere Beurteilung der Beschaffenheit der Extrazellulärmatrix. Nach Entparaffinisierung und Rehydrierung der histologischen Schnitte werden diese für 60 Minuten in einer gesättigten Pikrinsäurelösung mit 0,1% Sirius Red inkubiert. Anschließend werden die Proben zweimal für je zwei Minuten in 0,01N Salzsäure gewaschen und zweimal für je fünf Minuten in 100% Ethanol rehydratisiert. Zum

Schluss werden die Schnitte dreimal fünf Minuten in Xylol gereinigt und anschließend eingedeckt.

### 2.3.7 | Kombinierte Färbung mit Direktrot (picro sirius red) und Fast Green und Spektrophotometrie

Diese Methode (Joseph J., 2003) ist eine Weiterentwicklung der im Jahr 1979 von Junqueira et al. beschriebenen Methode zur spektrophotometrischen Quantifizierung von Kollagen. (Junqueira L., 1979) Sie macht sich die Bindung von Direktrot an Kollagen und von Fast Green an nicht-kollagene Proteine zu Nutze. Es werden jeweils 15 µm und 5 µm starke Paraffinschnitte verwendet, welche nach Entparaffinisierung und Rehydrierung für die Dauer von 30 Minuten in einer gesättigten Pikrinsäure-Lösung mit 0,1% Direktrot und 0,1% Fast Green inkubiert werden. Die 5 µm Schnitte werden mit 0,01M Salzsäure gewaschen und in 100% Ethanol rehydratisiert. Zum Schluss werden die Proben in Xylol gereinigt und mit Roti-Mount eingedeckt. Die 15µm Schnitte werden so lange unter schwach fließendem Leitungswasser gespült bis das Wasser farblos wird. Im Anschluss werden die Schnitte mit einem scharfen Skalpell vom Objektträger gelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wird eine Lösung aus 50% Methanol und 50% 0,1N NaOH hergestellt. Hiervon werden 2ml auf die Probe pipettiert, welche anschließend leicht geschüttelt wird, bis die Farbe vollständig in Lösung gegangen ist. Danach wird mit einem Photometer die Extinktion der Lösung bei 540nm und 605nm gemessen (entsprechend der maximalen Absorption für Direktrot und für Fast Green). Anschließend wird die korrigierte Absorption von Direktrot bei 540nm berechnet (korrigiert für den Anteil von Fast Green an der Absorption bei 540 nm), indem 29,1% der Absorption bei 605nm subtrahiert werden. Die Absorptionen werden nun durch die entsprechenden Farbäquivalente dividiert (2,08 für Direktrot und 38,4 für Fast Green) um die Werte für den Kollagengehalt bzw. den Gehalt an nicht-kollagenen Proteinen zu erhalten (vgl. Formel 1, wobei gilt  $E_x$ =Extinktion bei x nm und P=gemessene Probe). Der relative Gehalt an Kollagen im Verhältnis zum Gesamtprotein, ausgedrückt in Prozent, kann somit ermittelt werden.

#### Formel 1

$$\text{Direktrot}(P) = \frac{E_{540}(P) - 0,291 \times E_{605}(P)}{2,08}$$

$$\text{Fast Green}(P) = \frac{E_{605}(P)}{38,4}$$

$$\text{Gesamt}(P) = \text{Direktrot} + \text{Fast Green}$$

---

$$\text{Relativer Kollagengehalt (P)} = \frac{\text{Direktrot}}{\text{Gesamt}} \times 100\%$$

## 2.4 | Molekularbiologie

Die Proben für die molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen werden unmittelbar im Anschluss an die Dezellularisierung aus den Perikardstreifen herausgeschnitten und den entsprechen Analysen zugeführt, oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

### 2.4.1 | DNA-Quantifizierung

Durch die Quantifizierung der im Gewebe persistierenden DNA kann eine Aussage über die Fähigkeit der einzelnen Protokolle zur Reduktion von immunrelevantem Zellkernmaterial getroffen werden. Zur Isolation der DNA wird das QIAmp DNA Mini-Kit (Qiagen) verwendet. Es wird pro Dezellularisierungsprotokoll jeweils eine Probe aus vier unterschiedlichen Perikardstreifen verwendet (n=4). Dies ergibt eine Gesamtzahl von 48 Einzelmessungen. Die Isolation der DNA erfolgt gemäß dem entsprechenden Protokoll des Herstellers zur Verarbeitung von Gewebe, zuzüglich einiger Modifikationen. Die zu untersuchende Probe wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Mörser pulverisiert. Es werden jeweils 15-30 µg Probe abgewogen und in ein 2ml-Tube überführt. Um eine komplette Lyse zu ermöglichen wurden 40µl Proteinkinase statt 20µl verwendet und die Probe über Nacht oder für mindestens 12 Stunden inkubiert. Anschließend werden die Protokollschritte des Herstellers exakt eingehalten. Das weitere Verfahren beinhaltet die Bindung der DNA an die Oberfläche der Membran der Spinsäule, das Waschen der gebundenen Nucleinsäuren und die finale Elution. Die Quantifizierung der DNA erfolgt durch Messung der Extinktion bei 260 nm mit Hilfe eines Photometers (Invitrogen) welcher den DNA-Gehalt anhand einer eingespeicherten Standardkurve bestimmt. Zum Schluss werden die erhaltenen Werte im Verhältnis zum Gewicht des Ausgangsmaterials gesetzt.

### 2.4.2 | GAG-Quantifizierung

Glykosaminoglykane sind ein wichtiger Bestandteil der Extrazellulärmatrix. Dezellularisierungsverfahren sollten diese Substanz weitestgehend erhalten. Zur Ermittlung des Gehaltes an Glykosaminoglykanen wird der Blyscan GAG Assay (Bicolor) verwendet. Die Methode basiert auf der Bindung des Farbstoffes 1,9-Dimethylmethylenblau an sulfatierte Glukosaminoglykane und macht sich die maximale Absorption des Farbstoffes bei 656nm zu Nutze. Analog zur DNA-Quantifizierung werden 48 Einzelmessungen durchgeführt

---

(n=4). Die Proben werden schockgefroren und mit einem Mörser pulverisiert. Anschließend werden 25-50µg Gewebe abgewogen. Die Durchführung der Quantifizierung erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers. Für die photometrische Messung wird mit Hilfe von Standards aus Chondroitin-4-Sulfat eine Standardkurve erstellt. Die nach der photometrischen Bestimmung und mit Hilfe der Standardkurve abgeleiteten GAG-Konzentrationen werden im Verhältnis zum Gewicht des Ausgangsmaterials gesetzt.

### **2.4.3 | Western Blot Analyse**

Diese Methode ermöglicht mit Hilfe spezifischer Antikörper die Detektion von bestimmten Proteinen bzw. Antigenen. Für diese Arbeit sind das xenogene  $\alpha$ -Gal-Epitop sowie die ECM-Proteine Osteopontin und Kollagen Typ I Gegenstand der Untersuchung. Pro Protokoll wird aus drei verschiedenen Perikardstreifen jeweils eine Probe untersucht (n=3).

#### **2.4.3.1 Proteinaufarbeitung**

Die Gewebeprobe wird pulverisiert, abgewogen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Pro 100µg Gewebe werden 500µl RIPA-Puffer hinzugefügt und 15 Sekunden mit einer Ultraschallsonde sonifiziert. Anschließend wird die Probe 10 Minuten lang bei 12.000rpm zentrifugiert. Es entsteht ein Lysat (RIPA-Lysat), welches weiteren Analysen zugeführt wird, und es entsteht ebenso ein Zentrifugat welches in einem zweiten Verfahren lysiert wird. Hierfür werden dem Pellet pro mg Feuchtgewebe 2 µl 8M Harnstoff gegeben. Anschließend wird die Probe 15 Sekunden sonifiziert und 10 Minuten bei 60°C auf einem Thermoblock inkubiert. Danach wird die Probe 10 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das Lysat (Harnstoff-Lysat) wird den weiteren Analysen zugeführt. Die Überreste im Zentrifugat werden verworfen.

#### **2.4.3.2 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung in den RIPA-Lysaten erfolgt mit dem DC-Assay (Bio Rad). Für die Harnstoff-Lysate wurde der BCA-Assay (Thermo) verwendet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt gemäß den Angaben der jeweiligen Hersteller. Die Gesamtproteinkonzentration wird von einem Biophotometer (Eppendorf) durch Messung der Extinktion und mit Hilfe einer vordefinierten Standardkurve ermittelt.

#### **2.4.3.3 Blotting**

Es werden jeweils 10µg Protein pro Tasche verwendet. Die verwendeten Polyacrylamid-Gele enthalten Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1 (Bio Rad). Dabei besteht jedes Gel aus einem 5%-igen Sammelgel und einem 10%-igen Trenngel. Die Gelelektro-

---

phorese findet in einem XCell SureLock Mini-Cell System (Invitrogen) statt. Die Übertragung der Proteine auf die Trägermembran (Healthcare Life Sciences) erfolgt mit dem Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell System (Bio Rad) bei 250mA. Die Dauer des Blotting-Vorgangs beträgt 120 Minuten. Anschließend wird mittels Ponceau-Färbung überprüft, ob sich Proteinbanden auf der PVDF-Membran befinden. Wenn dies der Fall ist, wird die Membran gründlich mit einer TBST-Pufferlösung gespült und mit einer TBST-5%BSA-Lösung blockiert. Anschließend wird der Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wird nach einer gründlichen Spülung in TBST-Puffer der Zweitantikörper auf die Membran gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten gründlichen Waschschrift mit TBST-Puffer wird die Membran mit SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate (Thermo) bedeckt, in einer durchsichtigen Folie zugeschweißt und sofort in die Dunkelkammer (UVP) gelegt. Dort erfolgt eine integrierte Bildaufnahme über 10-20 Minuten. Eine semi-quantitative Auswertung erfolgt computergestützt mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms *ImageJ*. Das Programm ermittelt die Farbdichte der Proteinbanden auf den aufgenommenen Bildern. Für jeden Blot werden die Werte der dezellularisierten Proben in Relation zum Wert der nativen Probe angegeben.

## **2.5 | Biomechanische Testung**

Die biomechanische Testung erfolgte in Kooperation mit dem Institut für angewandte Medizintechnik - Helmholtz Institut - der RWTH Aachen.

### **2.5.1 | Probenaufarbeitung**

Die Perikardstreifen werden unmittelbar im Anschluss an die Dezellularisierung in steriler PBS-Lösung mit 2% Penicillin/Streptomycin bei 4°C aufbewahrt. Der Transport der Proben zum Versuchsort erfolgt in mit Brucheis gefüllten Kühlboxen. Die Perikardstreifen werden vor Ort mit Hilfe einer Stanze zu 4 x 0,6 cm langen Streifen präpariert. Mit Hilfe einer Schieblehre wird die Dicke jeder Probe ermittelt um das Volumen bestimmen zu können. Es werden pro Spezies jeweils zwei bis drei Proben aus jeweils zwei Herzbeuteln untersucht. Es wurden insgesamt 58 Einzelmessungen durchgeführt (n=4-6).

### **2.5.2 | Messung**

Die Testung erfolgt an einer Materialprüfmaschine der Firma Zwick/Röll. Die Perikardstreifen werden mit Hilfe einer Klemmvorrichtung mit einer wellförmigen Oberfläche

eingespannt. Um ein Gleiten der Probe innerhalb der Klemmvorrichtung der Maschine zu verhindern wurde zwischen den Innenflächen des Probenhalters und der Probe Sandpapier gelegt. Die Probe wird so eingespannt, dass die Ausgangslänge 10 mm ist. Die Zuggeschwindigkeit beträgt 1mm/Sekunde. Die vom Gerät gemessenen Parameter sind: Kraft (in Newton) und Weg (in mm). Es werden pro Millimeter ca. 100 Werte elektronisch in Form eines Datensatzes mit einer Genauigkeit von  $10^{-6}$  N bzw.  $10^{-6}$  mm gespeichert. Die Messung erfolgt bis zur vollständigen Durchtrennung der Probe.

### 2.5.3 | Auswertung

Aus den gemessenen Werten kann für jede Probe ein Weg-Kraft-Diagramm und ein Spannung-Dehnungs-Diagramms ermittelt werden. Die Spannung als Wert für das Ausmaß der Gewebedehnung, ist der Quotient aus der auf die Probe ausgeübten normierten Kraft und der tatsächlichen Querschnittsfläche (vgl. Formel 2).

**Formel 2**

$$\text{Spannung in } \frac{N}{mm^2} = \frac{\text{normierte Kraft in } N}{\text{tatsächliche Querschnittsfläche in } mm^2}$$

$$\text{Tatsächliche Querschnittsfläche in } mm^2 = \frac{\text{Ausgangsbreite in } mm \times \text{Ausgangslänge in } mm}{\text{Streckung}}$$

$$\text{Streckung} = \frac{\text{Dehnungslänge in } mm}{\text{Ausgangslänge in } mm}$$

Eine Möglichkeit das elastische Potential zu quantifizieren, welches im Gewebe enthalten ist bevor es zu einer plastischen Verformung kommt, ist die Ermittlung der sogenannten Energiedichte. Hierfür muss zunächst die Gesamtenergie ermittelt werden. Diese ist das Integral bzw. die Fläche unter der Kurve des Weg-Kraft-Diagramms im Bereich der gültigen Dehnung, d.h. ab Beginn der Verformung der Probe (Kraft bei erstmaligem Anstieg der Spannung) bis zum Anriss der Probe (Kraft bei maximaler Spannung). Die Berechnung der Energiedichte ergibt sich aus Formel 3.

**Formel 3**

$$\text{Energiedichte in } \frac{N}{mm^2} = \frac{\text{Gesamtenergie in } N \text{ mm}}{\text{Volumen in } mm^3 = \text{Breite in } mm \times \text{Länge in } mm \times \text{Dicke in } mm}$$

---

Die mathematische Formulierung des Spannungs-Dehnungsgesetzes unter der Voraussetzung homogener Körper führt zum Hook'schen Gesetz, welches besagt, dass für genügend kleine Deformationen eines Festkörpers, die Dehnung  $\varepsilon = \Delta l$  direkt proportional zur Spannung  $\sigma$  ist (vgl. Formel 4).

**Formel 4**

$$\sigma_x = E \cdot \varepsilon_x$$

Dabei steht E für die Elastizitätskonstante, auch E-Modul genannt. Es gilt für die Energiedichte und für das E-Modul folgendes Verhältnis:

**Formel 5**

$$\text{Energiedichte} = \frac{\text{Spannung} \cdot \text{Dehnung}}{2} = \frac{\text{Spannung}^2}{2 \cdot \text{Elastizitätsmodul}}$$

Daraus resultiert:

**Formel 6**

$$\text{Elastizitätsmodul} = \frac{\text{Spannung}^2}{2 \cdot \text{Energiedichte}}$$

## 2.6 | Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Programm SPSS (Version 22). Es wird ein zweiseitiger Dunnett-Test durchgeführt, bei dem geprüft wird, ob ein signifikanter Unterschied zwischen Mittelwerten der dezellularisierten Proben und dem Mittelwert der nativen Proben besteht. Ein p-Wert  $<0,05$  wird als signifikant betrachtet.

## 2.7 | Materialliste

<b>Acrylamid</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Alcianblau</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Alcianblaulösung</b>	1g Alcianblau und 1ml Eisessig in 100ml Aqua. dest.
<b>Alkalischer Alkohol</b>	10ml 25% Ammoniak + 90 ml 96% Ethanol
<b>Alpha-Gal-Epitop</b>	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA
<b>BCA Protein Assay Kit</b>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<b>Betaisadona-Lösung 10%</b>	10ml Betaisadona (Mundipharma) + 90ml Aqua dest.
<b>Blyscan GAG Assay</b>	Biocolor, Carrickfergus, UK
<b>Brillant Crocein</b>	Waldeck, Münster, DE
<b>Bovines Serum Albumin</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Crocein-Säurefuchsin-Lösung</b>	(80 ml einer Lösung aus 0,1g Brillant Crocein, 0,5ml Eisessig und 99,5ml Aqua dest) + (20ml einer Lösung aus 0,1g Säurefuchsin, 0,5ml Eisessig und 99,5ml Aqua dest.)
<b>DAPI</b>	Vector laboratories, Burlingame, USA
<b>DCA</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>DC Protein-Assay</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>Direktrot 80</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>DNase</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>ECL-Substrat</b>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<b>EDTA</b>	Merck, Darmstadt, DE
<b>Einschlussmittel Roti-Histokitt</b>	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<b>Elastase</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Eosin</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Essigsäure</b>	Merck, Darmstadt, DE
<b>Fast Green</b>	Merck, Darmstadt, DE
<b>Glycerin</b>	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<b>Hämatoxylin</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>HCl-Puffer</b>	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<b>Igepal CA-630</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Kollagen Typ I-Antikörper</b>	Merck, Darmstadt, DE
<b>MgCl</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Natriumazid</b>	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<b>PBS</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	Life technologies, Carlsbad, USA
<b>Pikrinsäure-Lösung</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE

---

<b>PVDF-Membran</b>	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK
<b>QIamp DNA Mini Kit</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>RIPA-Lösung</b>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<b>RNase A</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Saffron du Gatinais</b>	Waldeck, Münster, DE
<b>Saffron du Gatinais-Lösung</b>	6g Saffron du Gatinais in 100ml Ethanol lösen und luftdicht für 48 Stunden bei 50°C inkubieren
<b>Säurefuchsin</b>	Waldeck, Münster, DE
<b>SDS</b>	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<b>Gill-Hämatoxylin</b>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<b>TEMED</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>Tris-Puffer</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Triton X-100</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Trypsin</b>	Life Technologies, Carlsbad, USA
<b>Weigert's Eisenhämatoxylin</b>	(1,16g Eisenchlorid und 1ml 25% HCl in 100ml Aqua dest.) + (1g Hämatoxylin in 100ml 96% Ethanol)
<b>Wolframphosphorsäure</b>	Sigma Aldrich, Darmstadt, DE
<b>Osteopontin-Antikörper</b>	Abcam, Cambridge, UK

---

## 2.8 | Geräteliste

<b>Autoklav</b>	Systec, Linden, DE
<b>Biophotometer Plus</b>	Eppendorf, Hamburg, DE
<b>Braun-Sonic Homogenisator</b>	Braun Biotech, Goettingen, DE
<b>Eismaschine</b>	Scotsman, Ipswich, UK
<b>Epi ChemI II Darkroom</b>	UVP, Upland, USA
<b>Herasafe Werkbank</b>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<b>Kühlschrank</b>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<b>Materialprüfmaschine</b>	Zwick Roell, Ulm, DE
<b>Mikroskop</b>	Leica, Wetzlar, DE
<b>Mikrotom</b>	Leica, Wetzlar, DE
<b>Paraffin-Streckbad</b>	Medite, Burgdorf, DE
<b>pH-Sonde</b>	WTW, Weilheim, DE
<b>Präzisionswaage</b>	Sartorius, Göttingen, DE
<b>Präzitherm Heizplatte</b>	Gestigkeit, Angermund, DE
<b>Schüttelwasserbad</b>	GFL, Burgwedel, DE
<b>Rotationsschüttler</b>	Edmund Bühler, Hechingen, DE
<b>Schwenkplatte</b>	Heidolph, Schwabach, DE
<b>Thermomixer</b>	Eppendorf, Hamburg, DE
<b>Transblot-SD Semi Dry Transfer Cell</b>	BioRad, Hercules, USA
<b>Vortex Vibrofix</b>	IKA, Staufen, DE
<b>Wärmeschrank</b>	Binder, Tuttlingen, DE
<b>XCell SureLock Mini Cell</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Zentrifuge Universal 16</b>	Hettich, Tuttlingen, DE

## 3 | Ergebnisse

### 3.1 | Histologische Auswertung

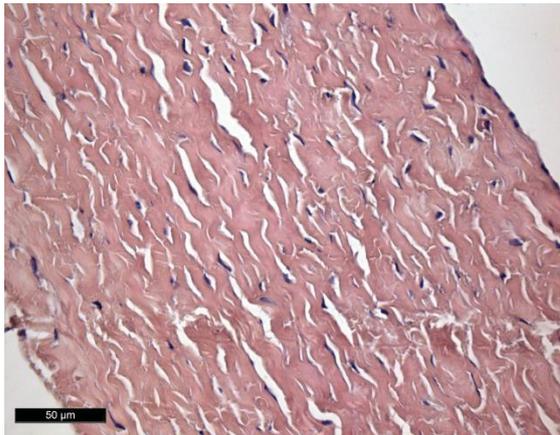
#### 3.1.1 | HE-Färbung

Die histologischen Schnitte der nativen porcinen und bovinen Proben zeigen ein ähnliches Bild: kompakt angeordnete, wellenförmig und parallel verlaufende Bindegewebsbündel (rosa), zwischendrin erscheinen gleichmäßig verteilte blaue Zellkerne.

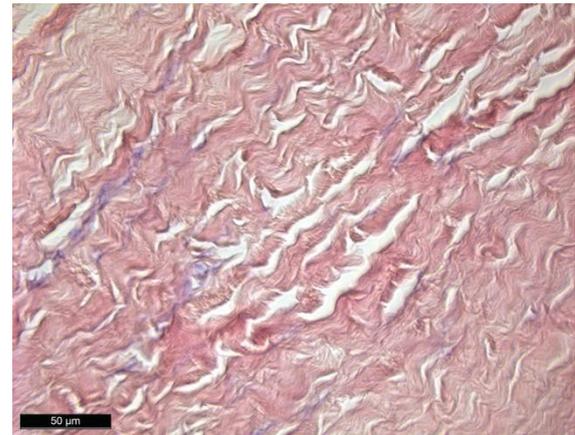
In den mit Protokoll I dezellulierten Proben beider Spezies sind basophile Zellkerne oder Zellkernfragmente inmitten der Bindegewebsmatrix zu erkennen. Letztere jedoch wird durch das Verfahren kaum in ihrer Struktur beeinträchtigt: es sind kaum Brüche oder Veränderungen im Verlauf und in der Anordnung der Bindegewebsfasern festzustellen.

In den histologischen Schnitten des mit Protokoll II behandelten porcinen Perikards sind keine Zellrückstände zu erkennen. In den bovinen Proben sind jedoch vereinzelt basophile Zellfragmente zu erkennen. Bei beiden Spezies führt Protokoll II zu einer leichten Veränderung der Bindegewebsstruktur. Die Verlaufsform der Fasern bleibt zwar kaum beeinträchtigt, jedoch weist die Matrix im Vergleich zum nativen Perikard größere Lücken zwischen den Faserbündeln auf.

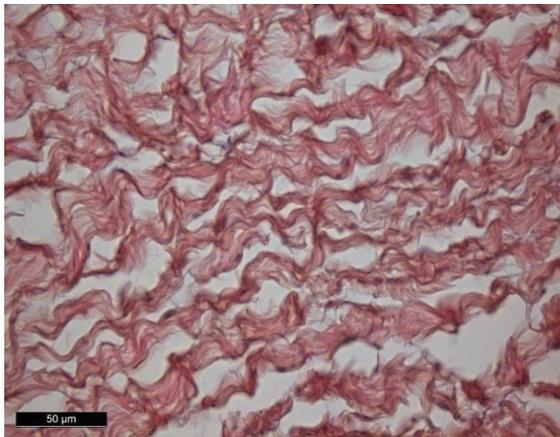
Protokoll III bis V haben eine gute Dezellularisierung bewirkt. Es sind bei beiden Spezies keine Zellkerne oder –fragmente zu erkennen. Allerdings fällt die Beeinträchtigung der Intaktheit des Bindegewebes unterschiedlich aus. Durch Protokoll III wirkt die Matrix stark aufgequollen, zeigt blasige Auftreibungen und brüchige Fasern. Protokoll IV führt zu einem ähnlichen Bild, jedoch mit weniger ausgeprägtem bullösem Gewebemuster. Protokoll V hingegen führt was die Struktur des Bindegewebes betrifft, zu einem Bild welches dem des nativen Perikards am nächsten kommt.



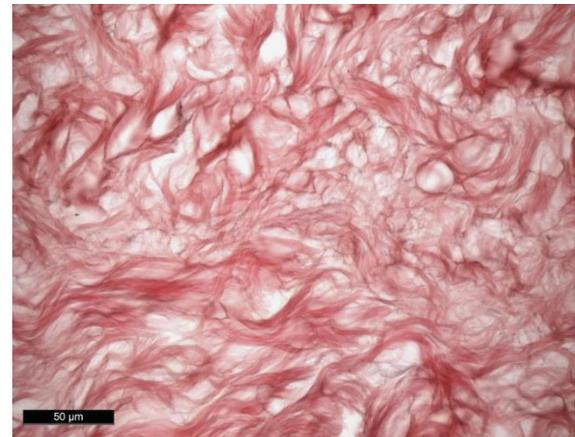
a) Nativ



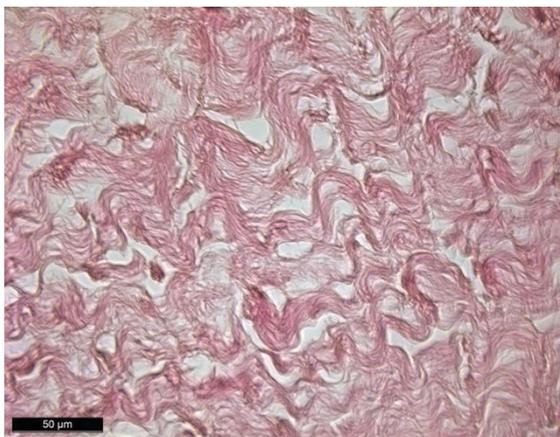
b) Protokoll I



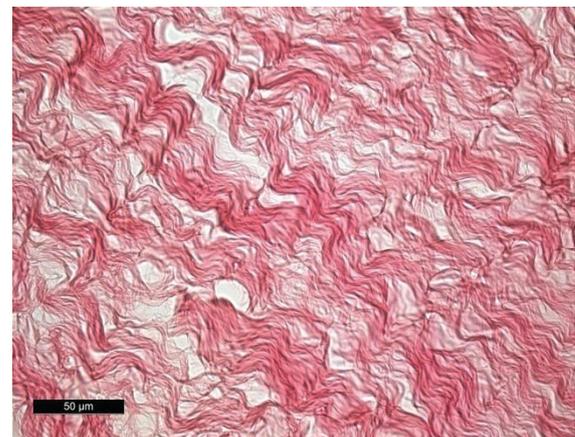
c) Protokoll II



d) Protokoll III

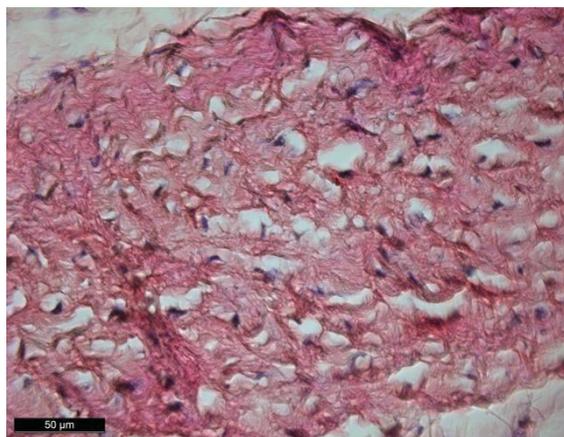


e) Protokoll IV

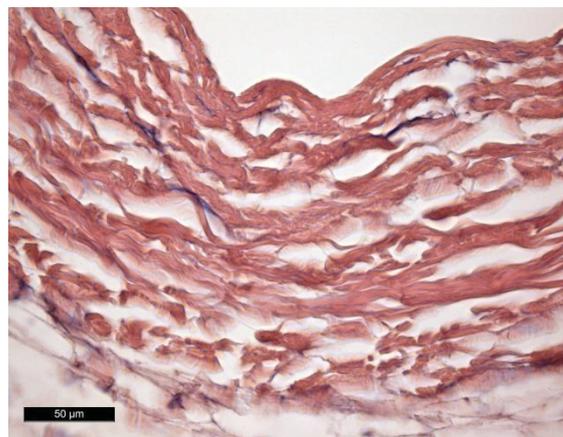


f) Protokoll V

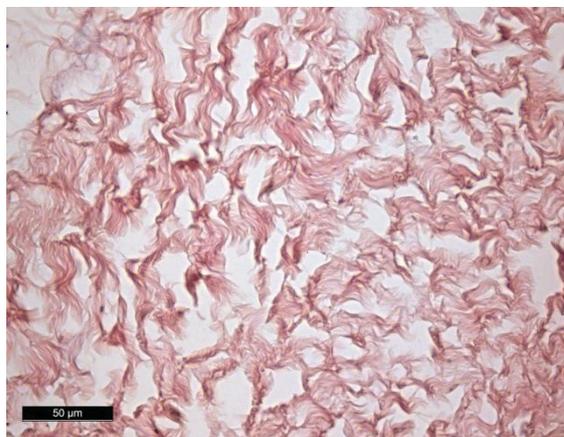
Abbildung 1 - Bovines Perikard HE-Färbung (40x Vergrößerung)



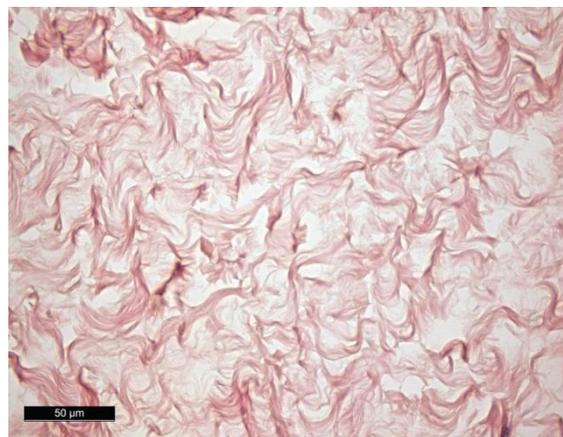
a) Nativ



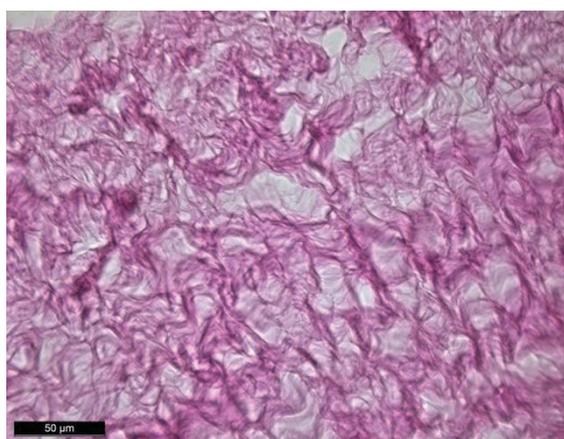
b) Protokoll I



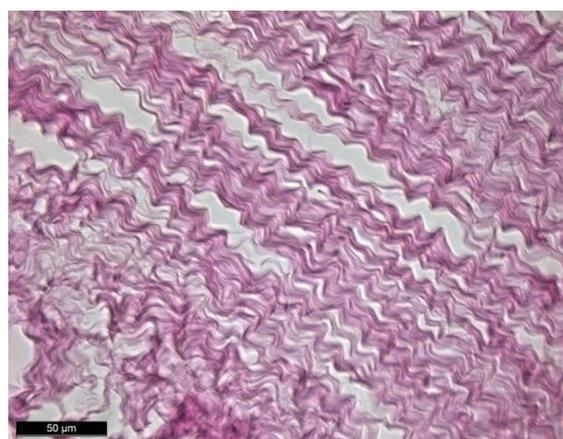
c) Protokoll II



d) Protokoll III



e) Protokoll IV

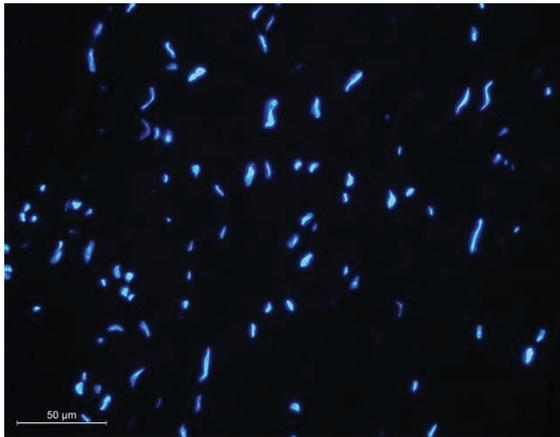


f) Protokoll V

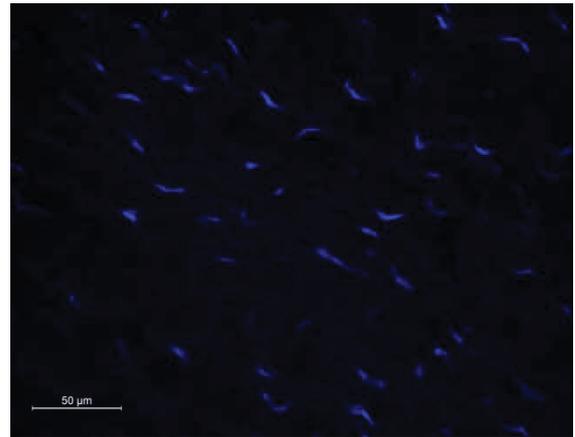
**Abbildung 2 – Porcines Perikard HE-Färbung (40x Vergrößerung)**

### 3.1.2 | DAPI-Färbung

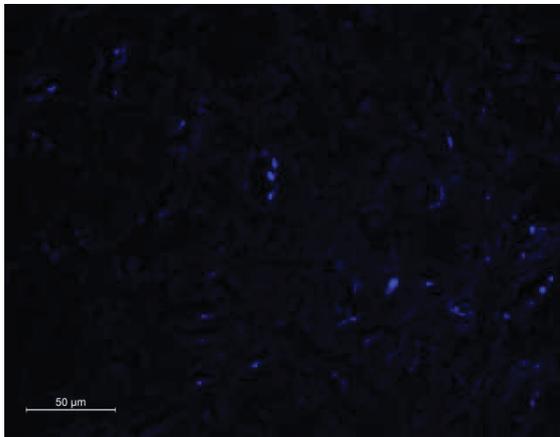
In den histologischen Bildern der nativen Proben ist durch die blau fluoreszierende Erscheinung von Nukleinsäuren, das Vorhandensein von Zellkernen deutlich zu erkennen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der HE-Färbung, zeigt sich auch in der DAPI-Färbung bei beiden Spezies eine schlechte Dezellularisierung durch Protokoll I. Es sind jeweils noch Zellfragmente, teilweise ganze Zellkerne zu erkennen. Das Vorhandensein von Zellkernmaterial, welches sich für Protokoll II bei der HE-Färbung lediglich bei den bovinen Proben zeigte, wird durch die DAPI-Färbung bestätigt. Allerdings ist zusätzlich das Vorhandensein von DNA-Material in den porcinen Proben zu erkennen. Auch Protokoll III kann bei beiden Spezies keine adäquate Dezellularisierung erreichen. Bei Protokoll IV und V zeigt sich bei beiden Spezies keinerlei Fluoreszenz.



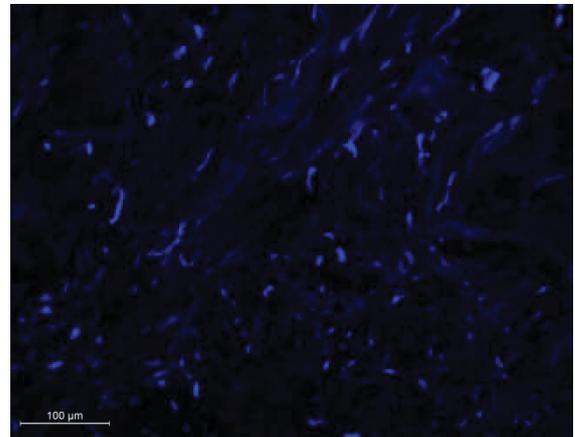
a) Nativ



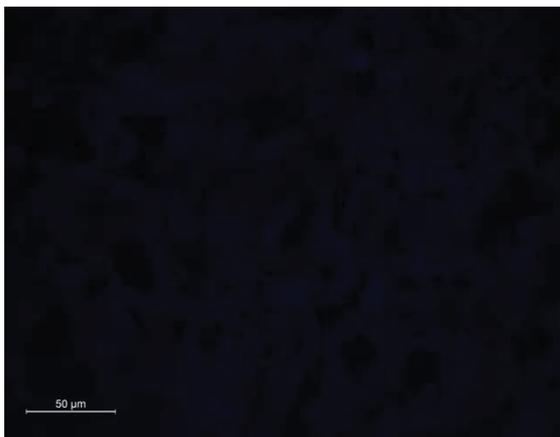
b) Protokoll I



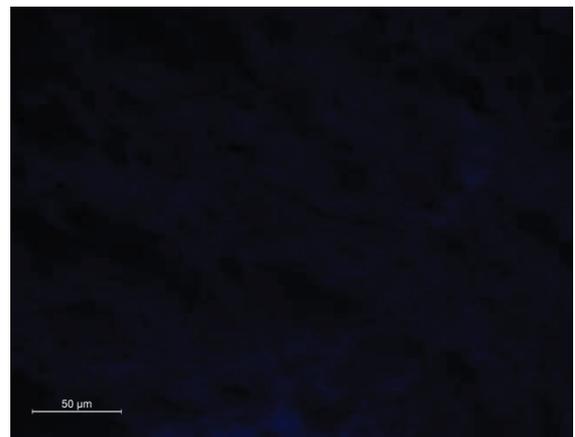
c) Protokoll II



d) Protokoll III

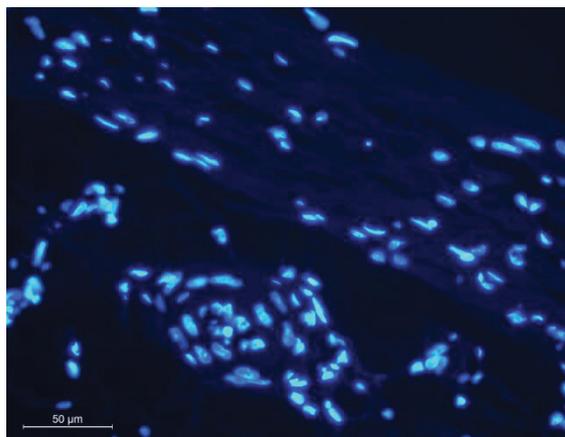


e) Protokoll IV

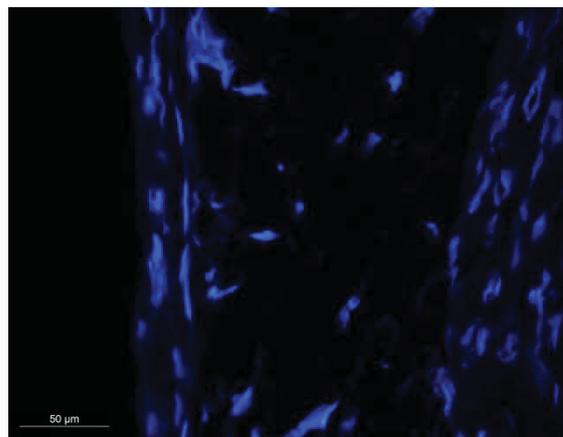


f) Protokoll V

**Abbildung 3 - Bovines Perikard DAPI-Färbung (40x Vergrößerung)**



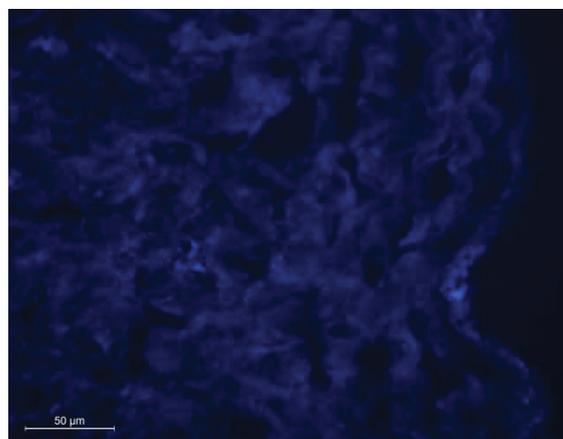
Nativ



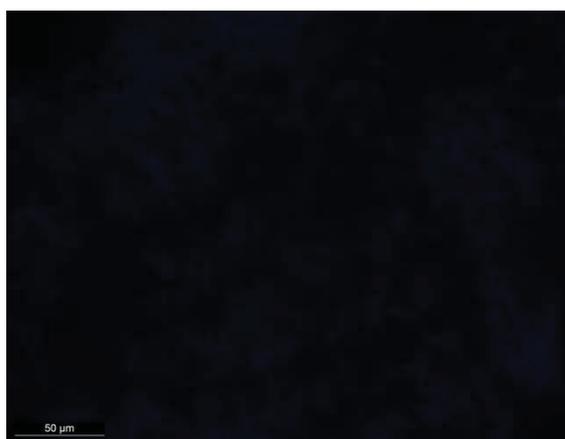
Protokoll I



Protokoll II



Protokoll III



Protokoll IV

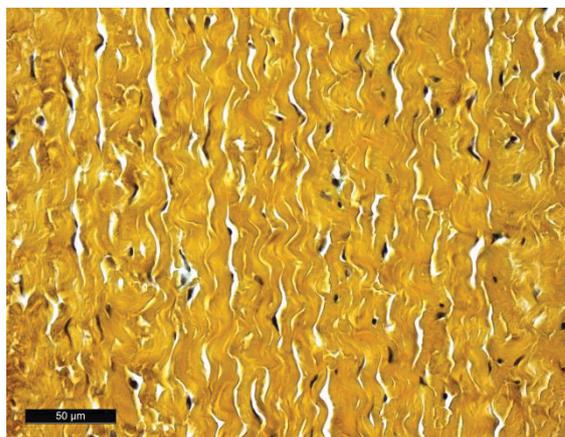


Protokoll V

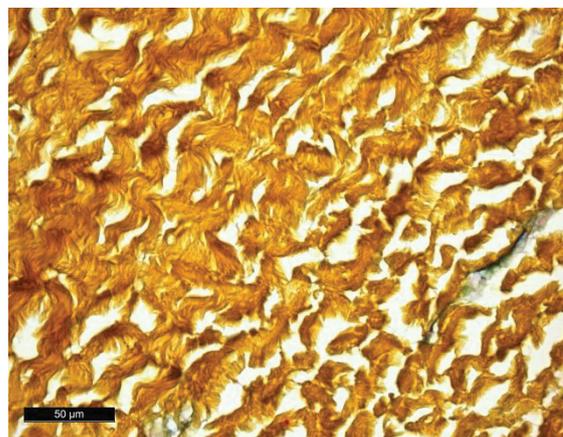
**Abbildung 4 – Porcines Perikard DAPI-Färbung (40x Vergrößerung)**

### 3.1.3 | Movat's Pentachrome Färbung

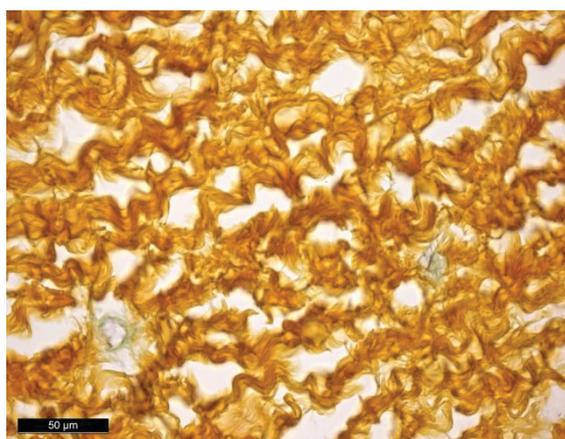
In allen nativen und dezellularisierten Proben imponiert das Perikard durch Safran-Gelb gefärbtes kollagenes Bindegewebe. Lediglich sporadisch zeigen sich in einigen Schnitten zwischen den Kollagenschichten rot gefärbte elastische Fasern oder grünblau gefärbte Glykosaminoglykane.



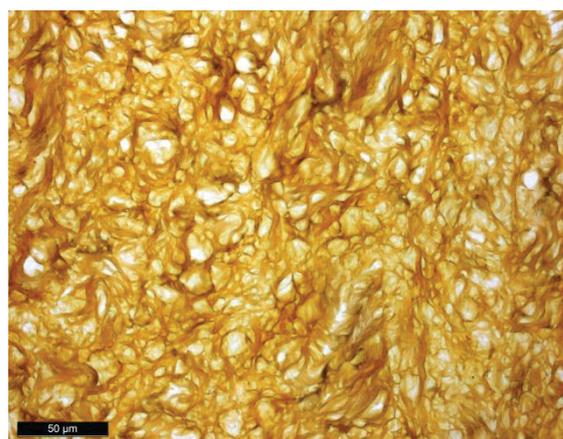
a) nativ



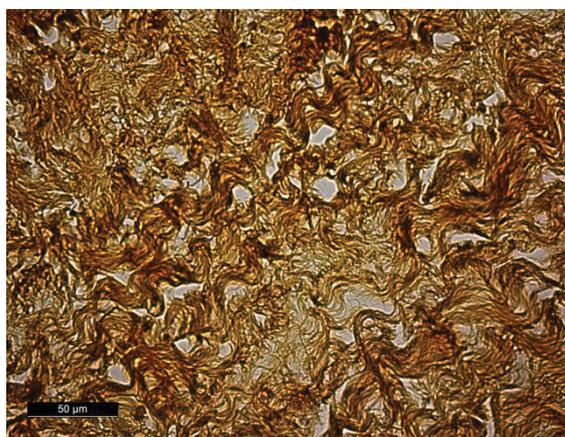
b) Protokoll I



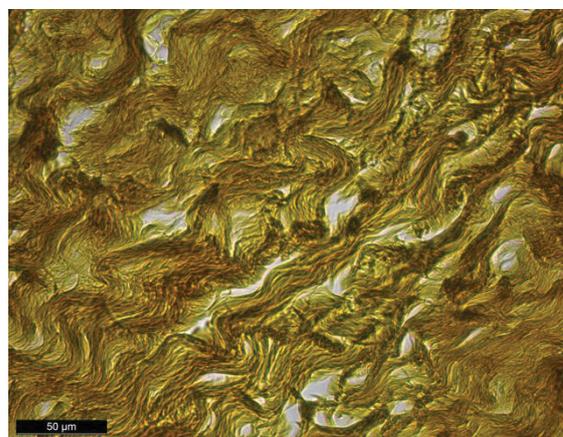
c) Protokoll II



d) Protokoll III

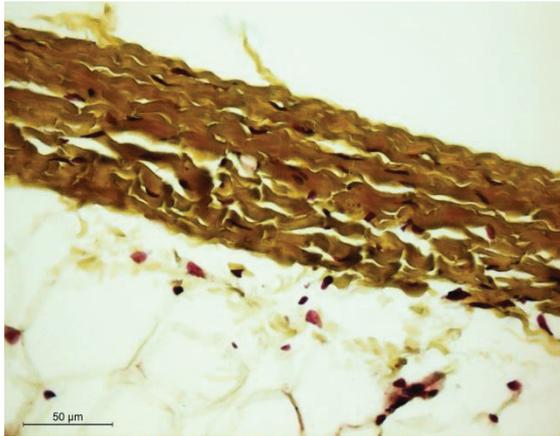


e) Protokoll IV

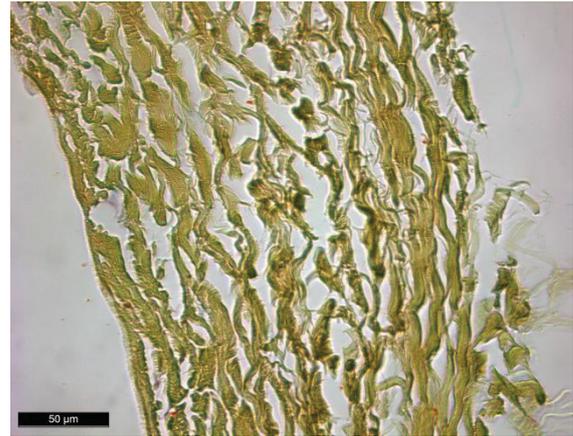


f) Protokoll V

Abbildung 5 - Bovines Perikard Movat-Färbung (40x Vergrößerung)



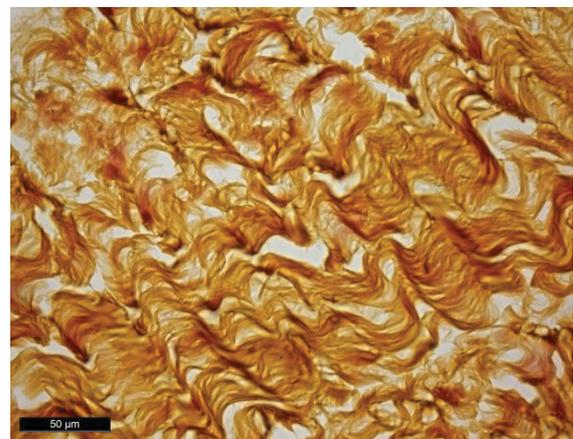
a) nativ



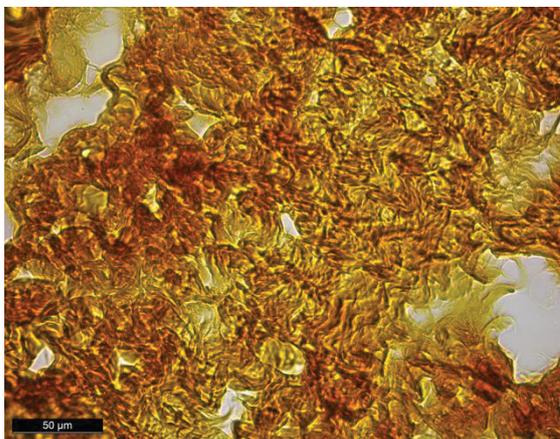
b) Protokoll I



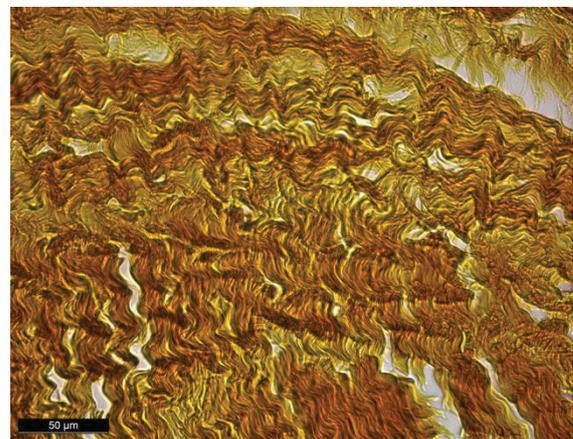
c) Protokoll II



d) Protokoll III



e) Protokoll IV

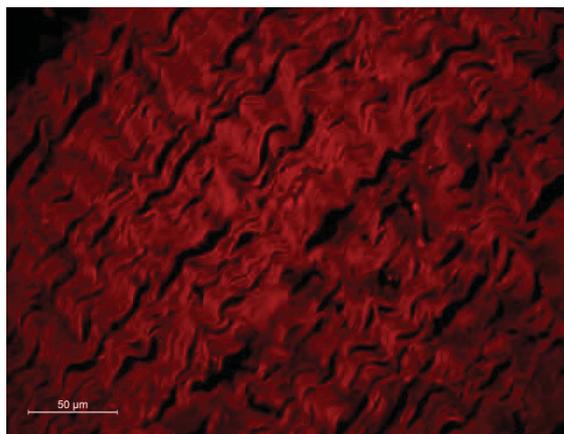


f) Protokoll V

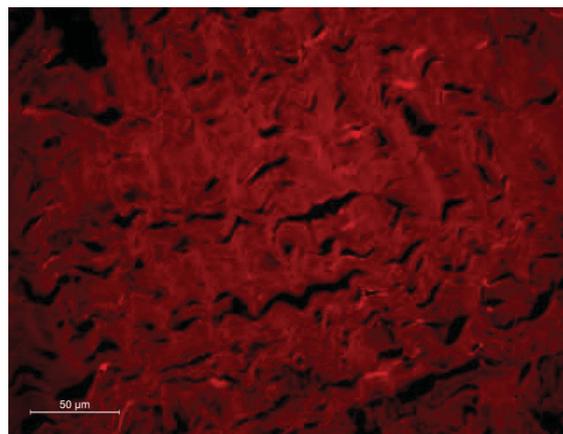
Abbildung 6 - Porcines Perikard Movat-Färbung (40x Vergrößerung)

### **3.1.4 | Picro Sirius Red Färbung**

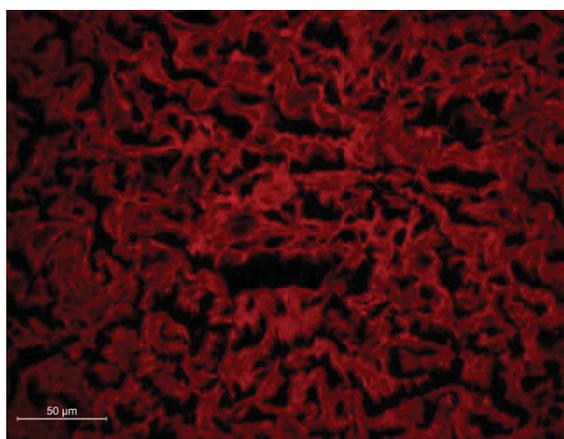
Analog zu den Ergebnissen der HE-Färbung zeigt sich in allen dezellularisierten Perikardproben eine Auflockerung in der Anordnung der Kollagenfasern. Insbesondere Protokoll III und IV führen zu einer deutlichen Auflockerung des Kollagenfaserverbandes. Die geringsten strukturellen Veränderungen sind bei denjenigen Proben zu beobachten, welche mit Protokoll V behandelt wurden. Hier erscheinen die Kollagenfasern nach wie vor dicht aneinandergereiht und wenig durch Brüche oder Risse geschädigt.



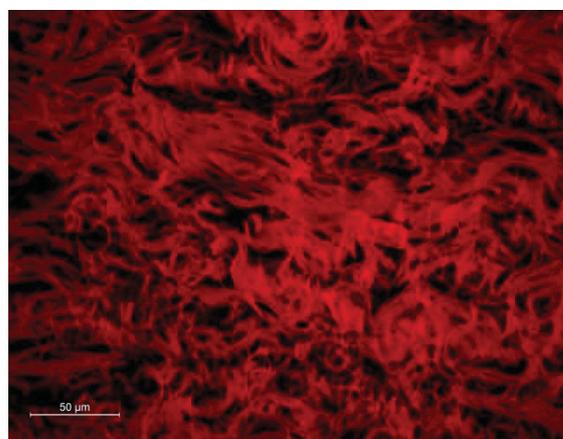
nativ



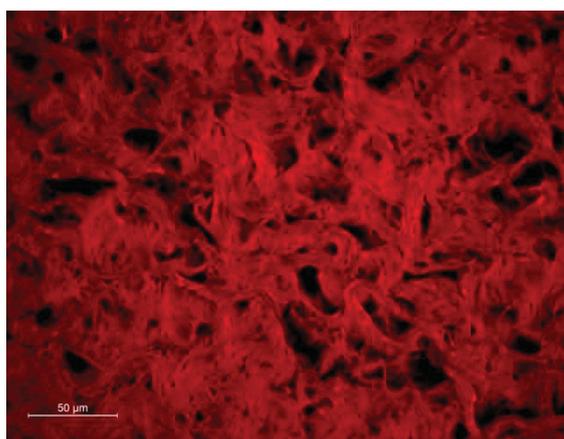
Protokoll I



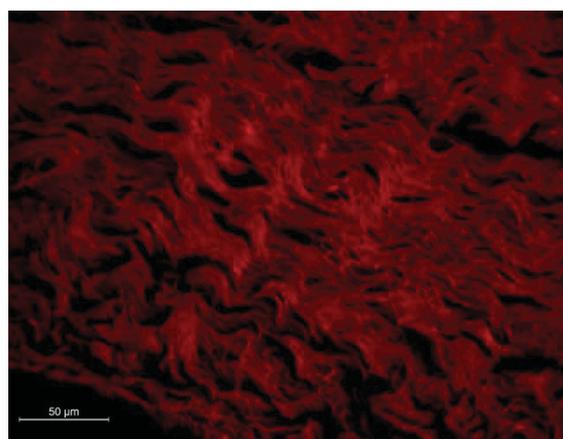
Protokoll II



Protokoll III

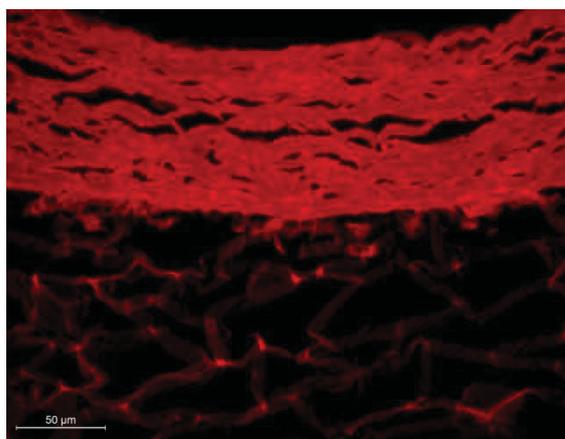


Protokoll IV

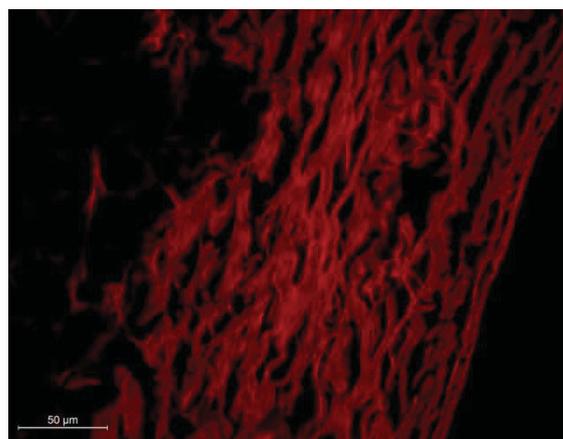


Protokoll V

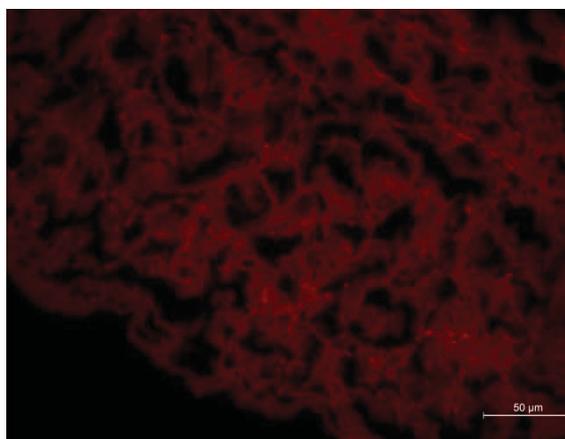
Abbildung 7 - Bovines Perikard Picro Sirius Red Färbung (40x Vergrößerung)



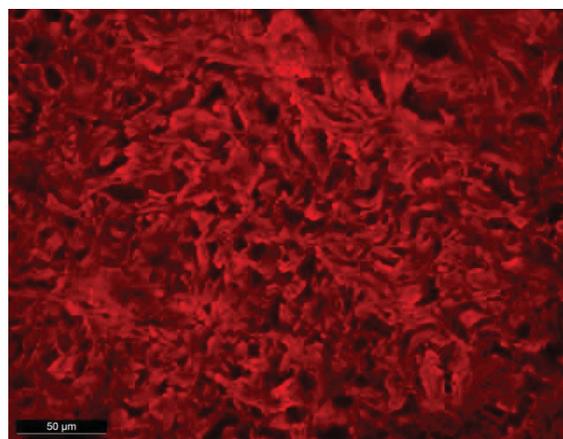
a) nativ



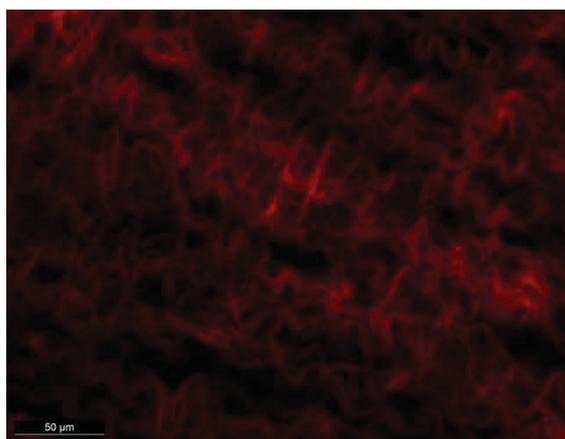
b) Protokoll I



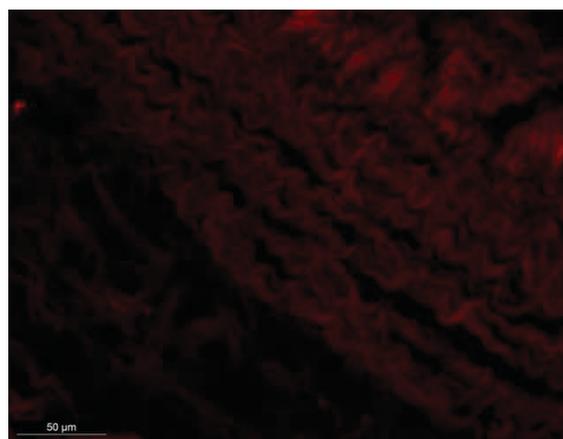
c) Protokoll II



d) Protokoll III



e) Protokoll IV



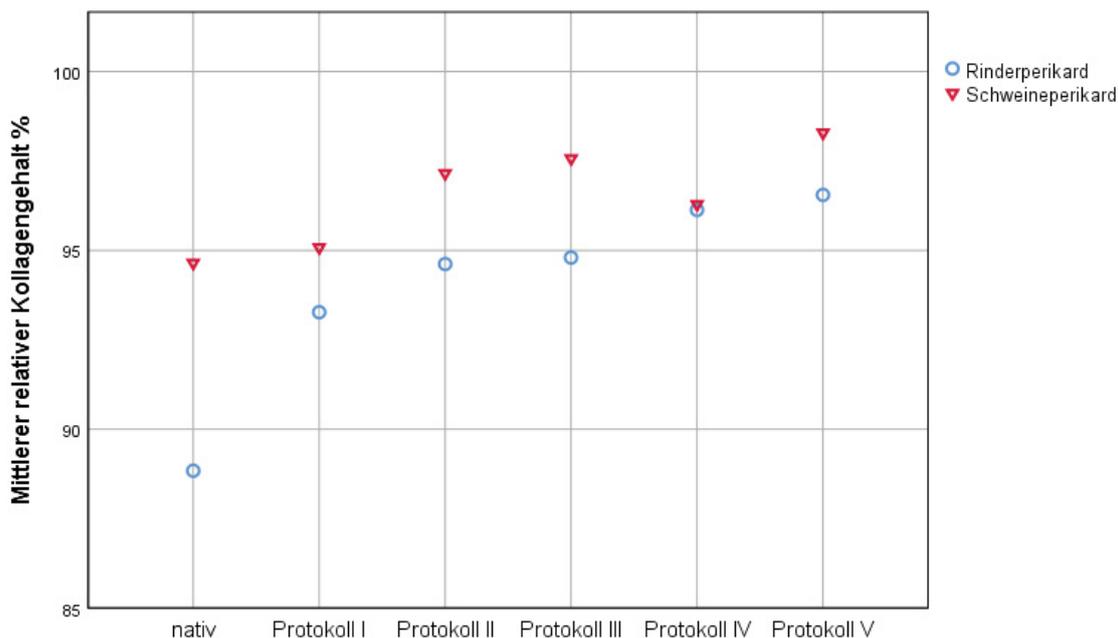
f) Protokoll V

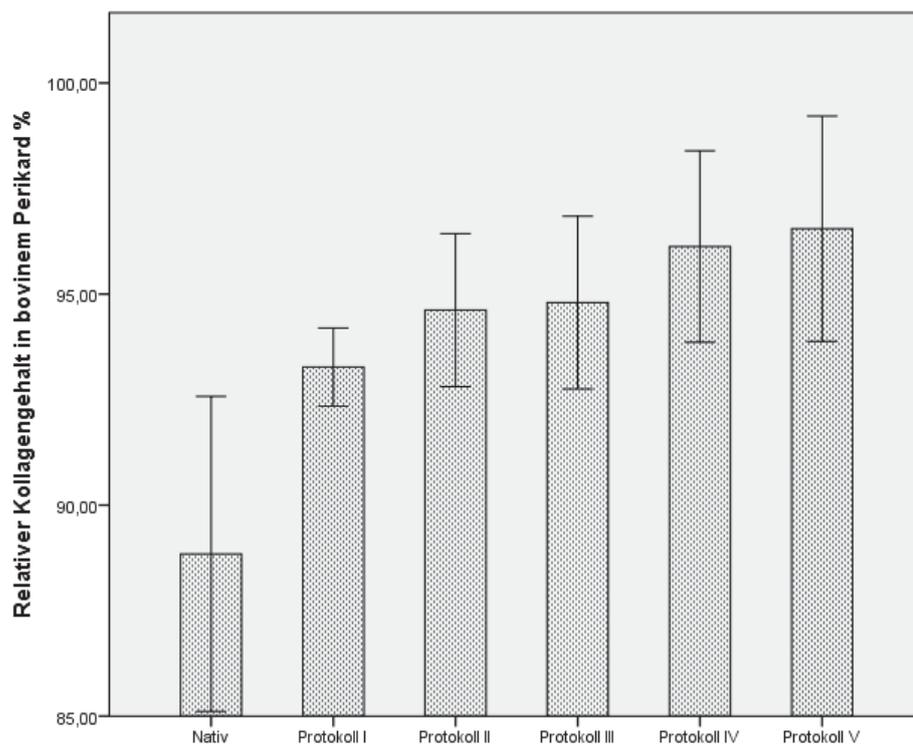
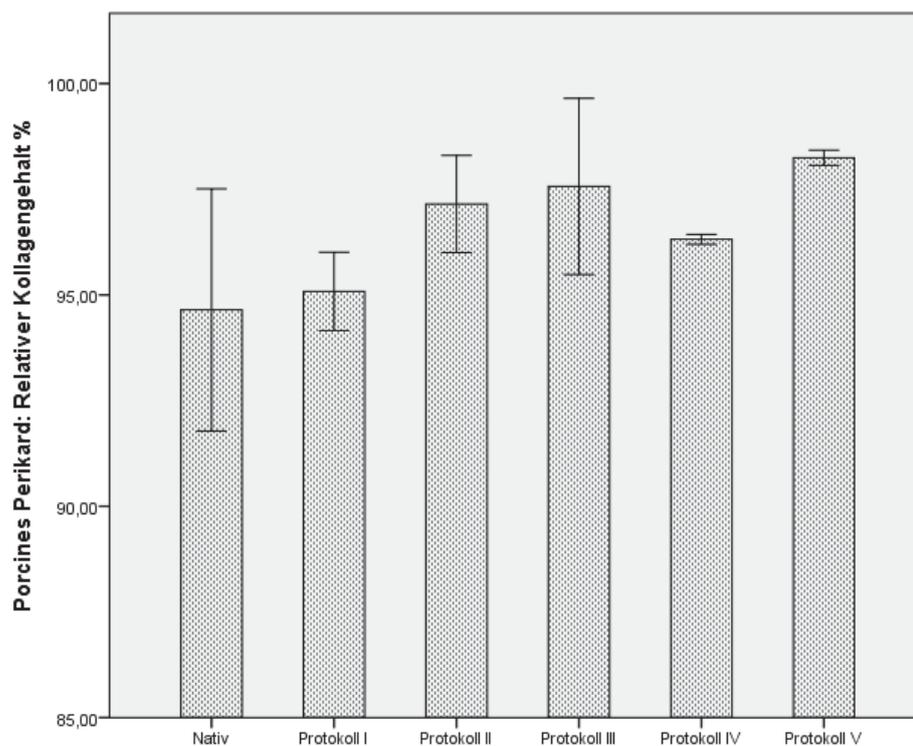
Abbildung 8 - Porcines Perikard Picro Sirius Red Färbung (40x Vergrößerung)

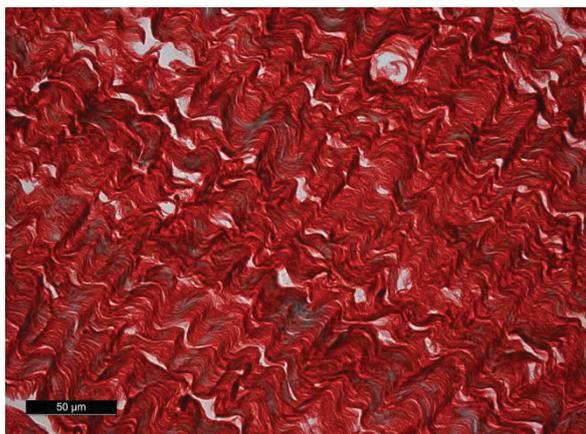
### 3.1.5 | PSR/FG-Färbung und relativer Kollagengehalt

Natives Perikard beider Spezies erscheint durch diese Methode hauptsächlich rot eingefärbt, was auf ein Imponieren von Kollagenfasern in der ECM des Perikards schließen lässt, und die Aussage der Ergebnisse der Movat's Pentachrome-Färbung bestätigt. Alle dezellulisierten Präparate beider Spezies sind deutlich grüner eingefärbt, was auf ein Vorhandensein nicht-kollagener Proteine rückschließen lässt. Dieses Ergebnis deckt sich jedoch nicht gänzlich mit dem Ergebnis der spektrophotometrischen Kollagenbestimmung. In dieser zeigt sich nämlich eine Zunahme des relativen Kollagengehaltes der dezellulierten Perikardproben im Vergleich zu den nativen. Diese Zunahme ist jedoch in bovinem Perikard, welches mit dem Protokoll I behandelt wurde, und ebenso in porcinem Perikard, welches mit den Protokollen I-IV behandelt wurde, als nicht signifikant zu werten. Auf die Bewertung dieses Ergebnisses wird in der Diskussion dieser Arbeit näher eingegangen.

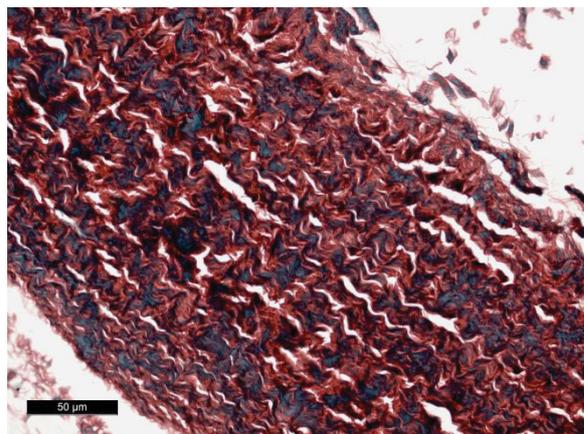
Diagramm 1 – Spektrophotometrie: Relativer Kollagengehalt bovines vs. porcines Perikard



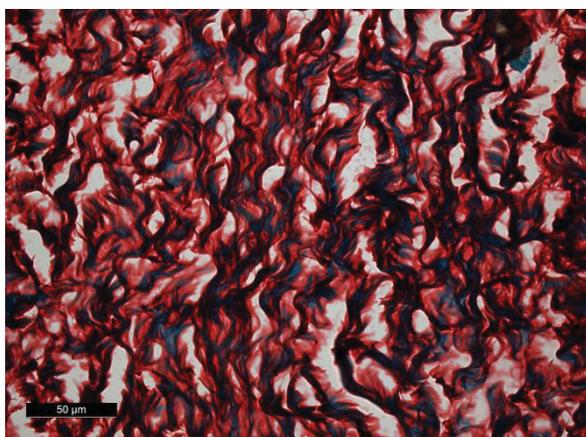
**Diagramm 2- Relativer Kollagengehalt in bovinem Perikard (kolorimetrische Bestimmung)****Diagramm 3 - Relativer Kollagengehalt in porcinem Perikard (kolorimetrische Bestimmung)**



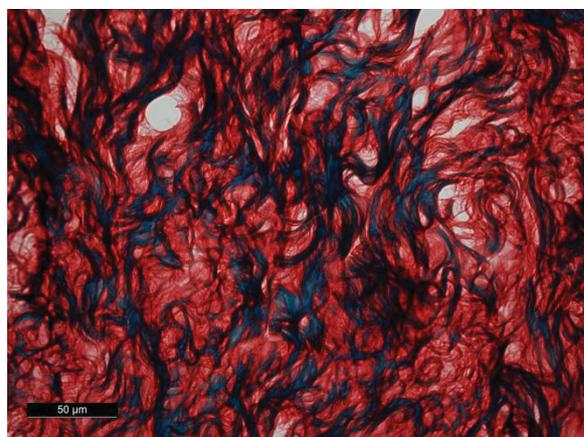
a) Nativ



b) Protokoll I



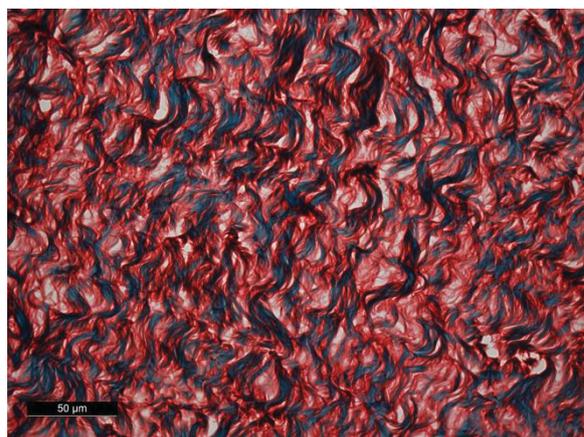
c) Protokoll II



d) Protokoll III

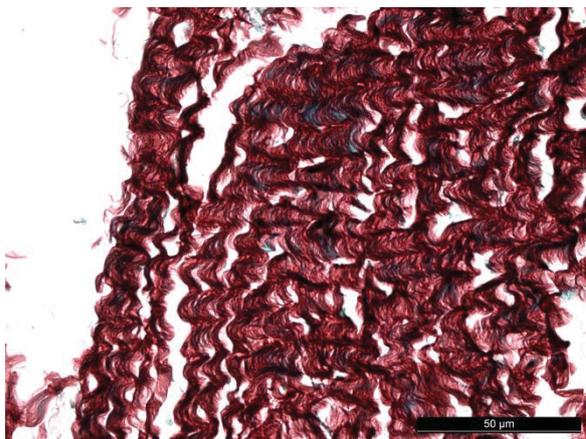


e) Protokoll IV

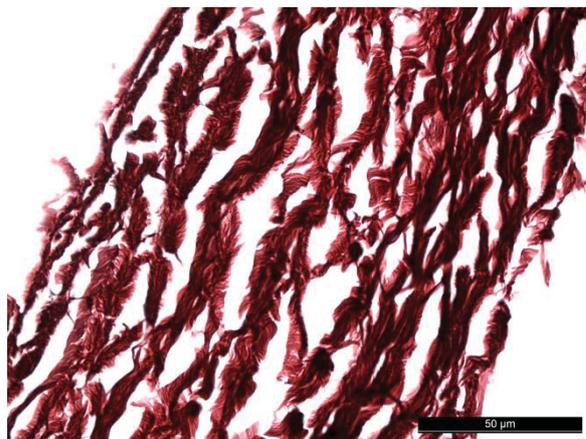


f) Protokoll V

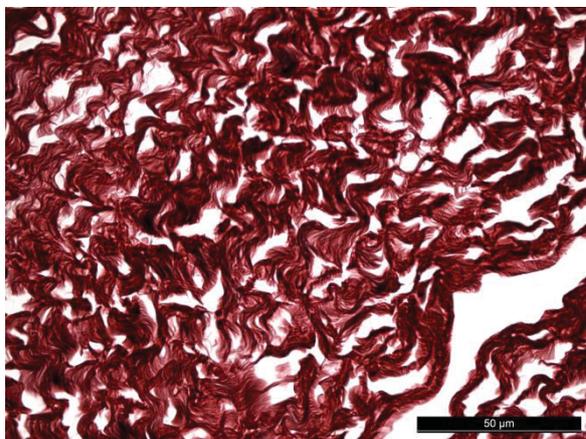
Abbildung 9 - Bovines Perikard Sirius Red-Fast Green Färbung (40x Vergrößerung)



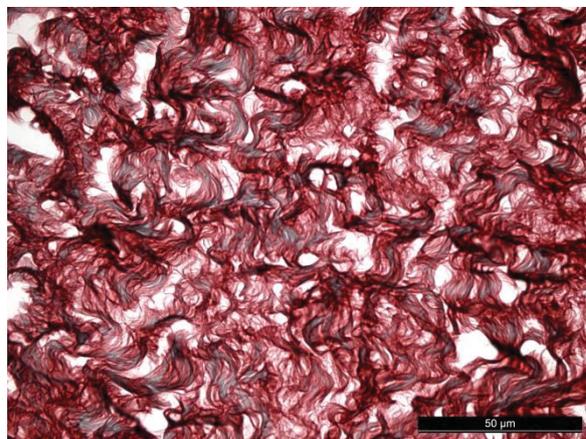
a) Nativ



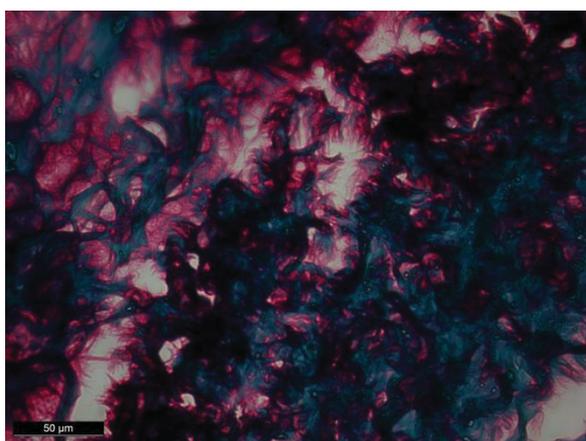
b) Protokoll I



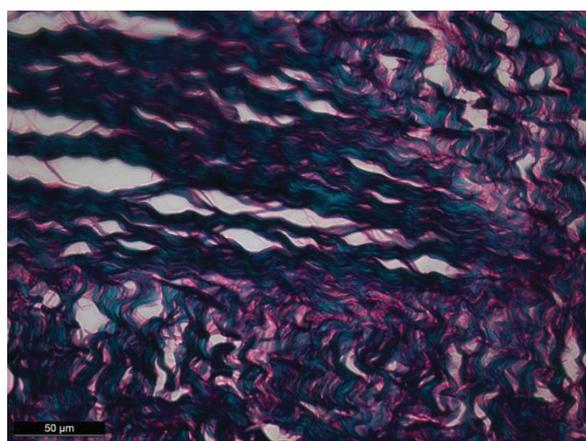
c) Protokoll II



d) Protokoll III



e) Protokoll IV



f) Protokoll V

Abbildung 10 - Porcines Perikard Sirius Red-Fast Green-Färbung (40x Vergrößerung)

## 3.2 | Molekularbiologische Auswertung

### 3.2.1 | DNA-Gehalt

Alle Protokolle führen zu einer Reduktion des DNA-Gehaltes. Lediglich für das porcine Perikard welches mit Protokoll I behandelt wurde ist die Reduktion als nicht signifikant zu werten. Trotz signifikanter DNA-Reduktion ( $p < 0,03$ ) in den restlichen Gruppen, erreicht keines der Protokolle eine vollständige Eliminierung von Desoxyribonukleinsäuren. Die höchste Reduktion im Vergleich zum nativen Perikard erreicht Protokoll V bei einer Reduktion von ca. 73,5% im bovinen Perikard und einer Reduktion von 71,7% im porcinen Perikard.

Diagramm 4 – Mittlerer DNA-Gehalt in bovinem und porcinem Perikard

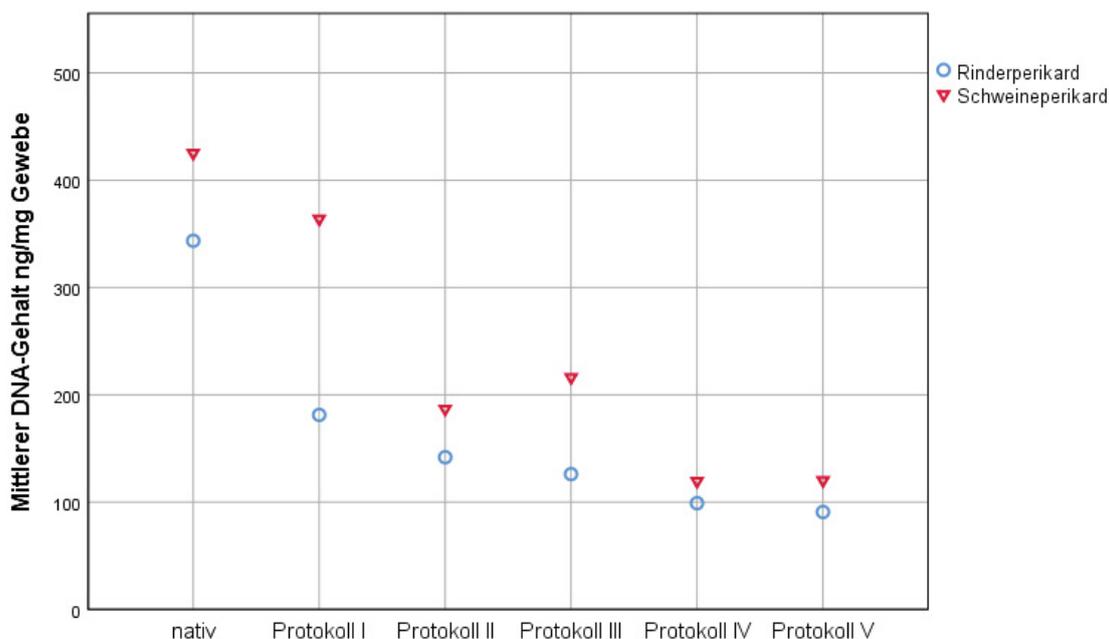


Diagramm 5 - DNA-Gehalt in bovinem Perikard

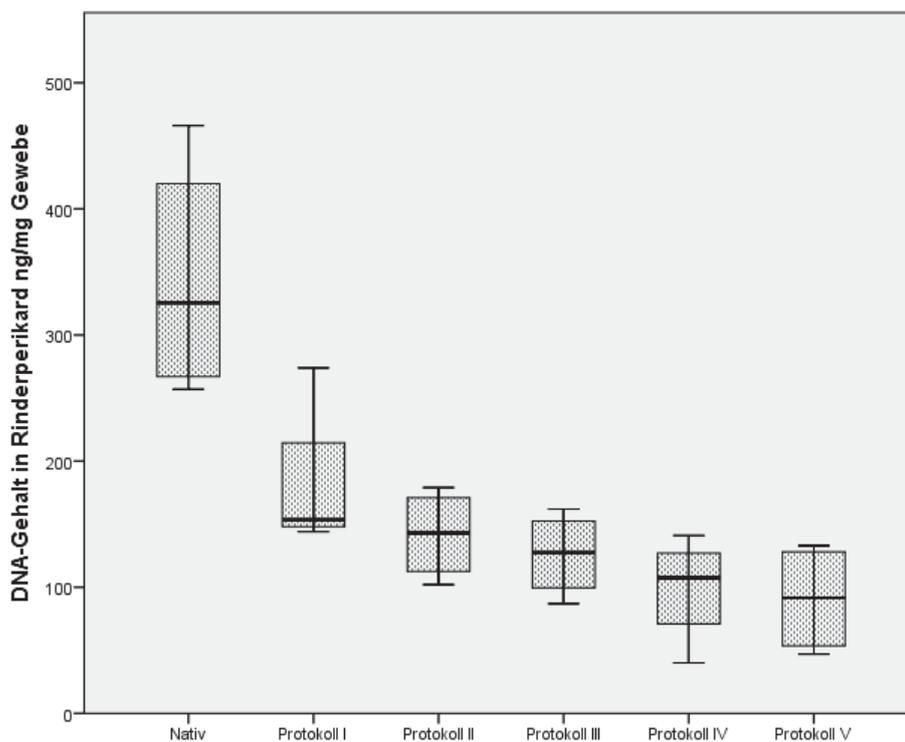


Tabelle 5 – DNA-Gehalt in bovinem Perikard

	n	Mittelwert ng/mg	SD ng/mg	Minimum ng/mg	Maximum ng/mg	Signifikanz (vs. Nativ)
Nativ	4	343,50	96,33	257	466	
Protokoll I	4	181,25	62,00	144	274	<b>,003</b>
Protokoll II	4	141,75	35,45	102	179	<b>&lt;0,001</b>
Protokoll III	4	126,00	33,17	87	162	<b>&lt;0,001</b>
Protokoll IV	4	99,00	42,62	40	141	<b>&lt;0,001</b>
Protokoll V	4	90,75	43,53	47	133	<b>&lt;0,001</b>

Diagramm 6 - DNA-Gehalt in porcinem Perikard

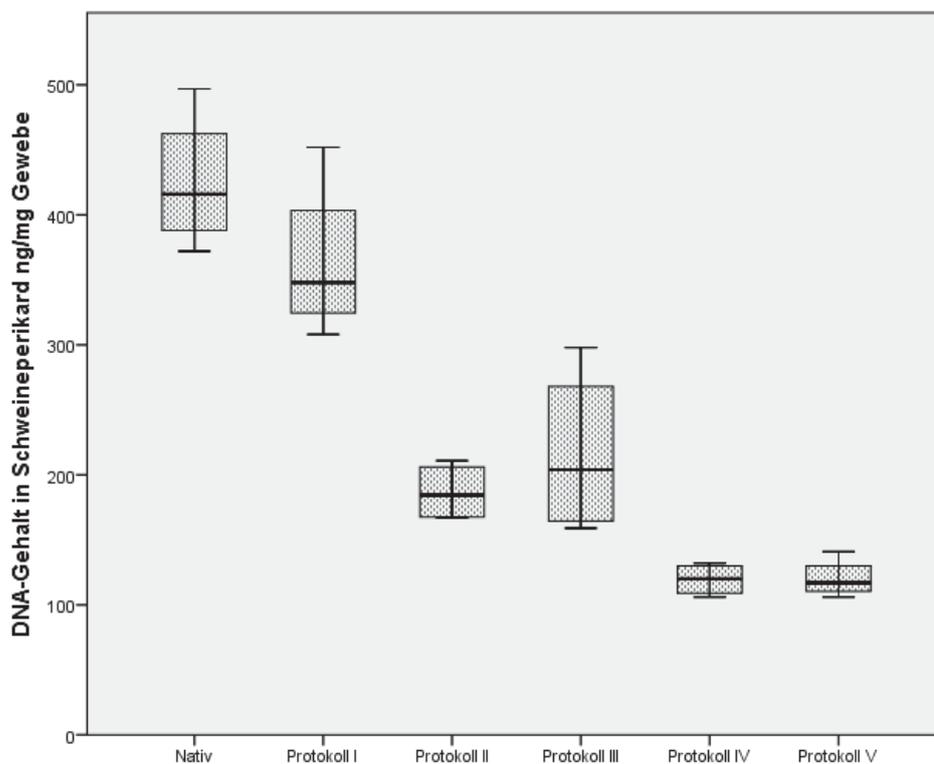


Tabelle 6 – DNA-Gehalt in porcinem Perikard

	n	Mittelwert ng/mg	SD ng/mg	Minimum ng/mg	Maximum ng/mg	Signifikanz (vs. Nativ)
Nativ	4	425,25	53,05	372	497	
Protokoll I	4	364,00	61,88	308	452	,222
Protokoll II	4	186,75	22,60	167	211	<0,001
Protokoll III	4	216,25	64,73	159	298	<0,001
Protokoll IV	4	119,50	12,47	106	132	<0,001
Protokoll V	4	120,25	14,86	106	141	<0,001

### 3.2.2 | GAG-Gehalt

Die Protokolle I und II führen zu keiner signifikanten Reduktion von Glykosaminoglykanen im Vergleich zum nativen Perikard. Die Protokolle III bis V führen sowohl in porcinem als auch in bovinem Perikard zu einer signifikanten Reduktion des GAG-Gehaltes ( $p < 0,036$ ).

Diagramm 7 – Mittlerer GAG-Gehalt in bovinem und porcinem Perikard

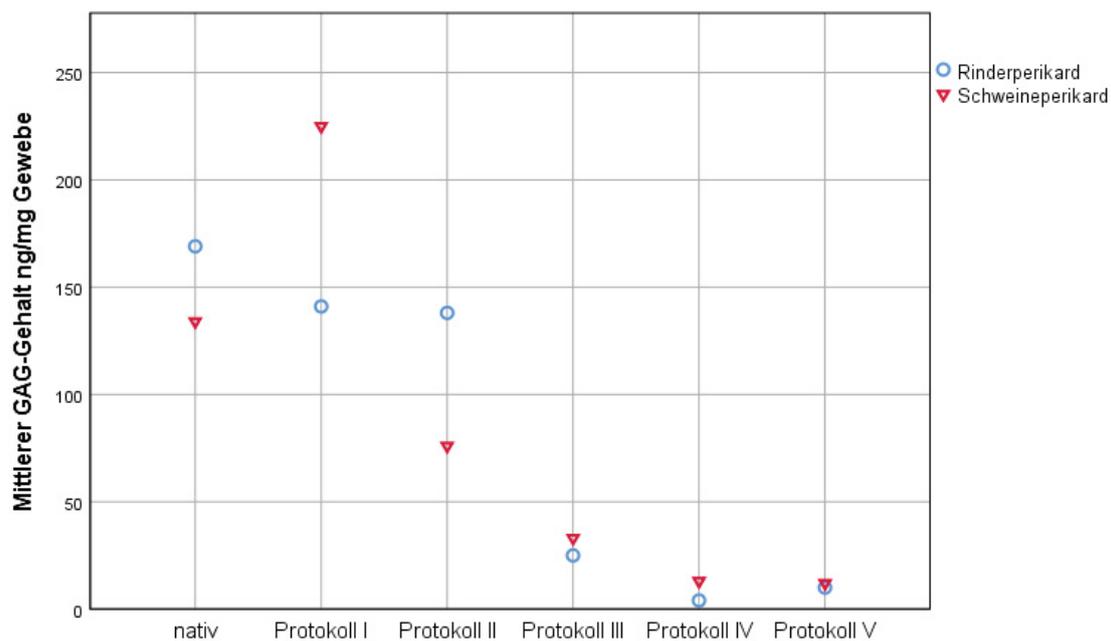


Diagramm 8 - GAG-Gehalt in bovinem Perikard

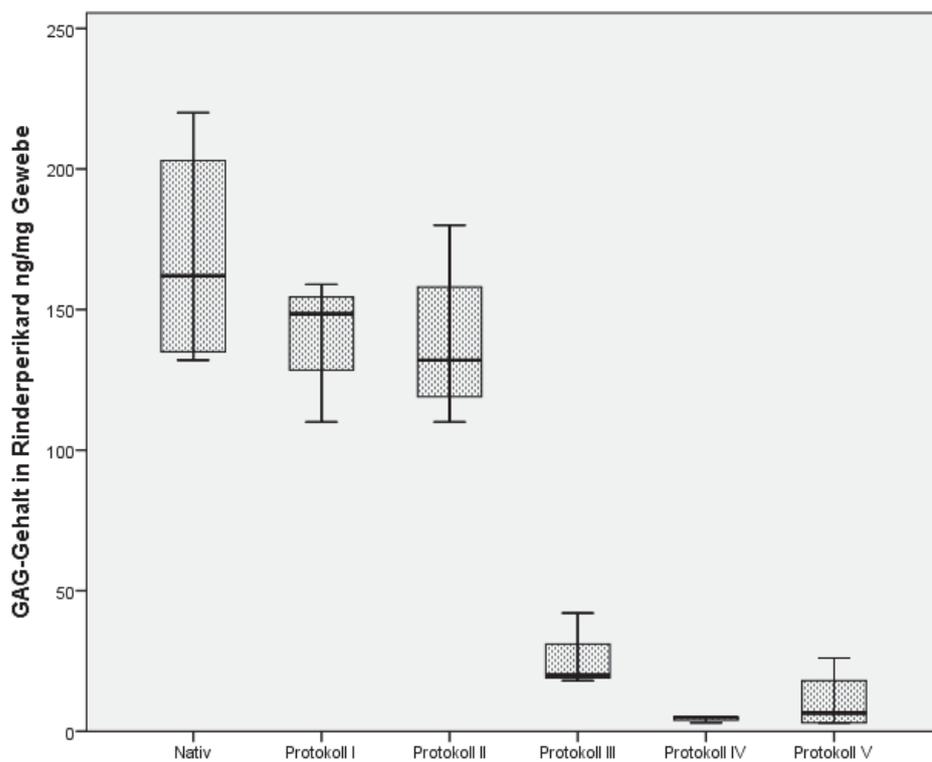


Tabelle 7 - GAG-Gehalt in bovinem Perikard

	n	Mittelwert ng/mg	SD ng/mg	Minimum ng/mg	Maximum ng/mg	Signifikanz (vs. Nativ)
Nativ	4	169,00	41,71	132	220	
Protokoll I	4	141,50	21,61	110	159	,362
Protokoll II	4	138,50	29,72	110	180	,275
Protokoll III	4	25,00	11,37	18	42	<0,001
Protokoll IV	4	4,50	1,00	3	5	<0,001
Protokoll V	4	10,50	10,84	3	26	<0,001

Diagramm 9 - GAG-Gehalt in porcinem Perikard

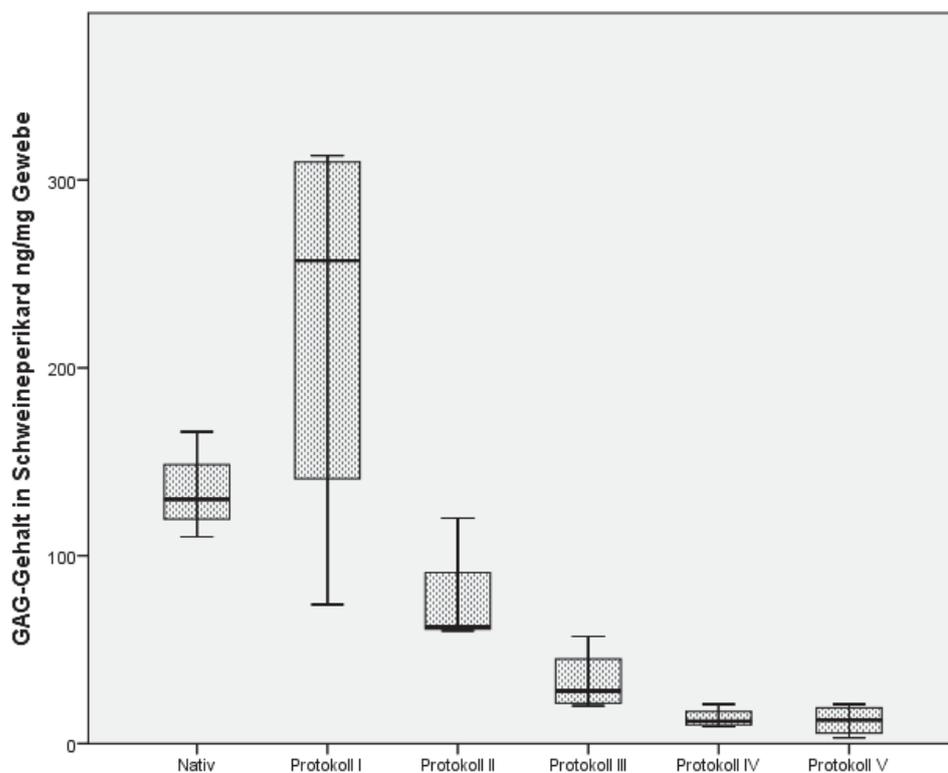


Tabelle 8 - GAG-Gehalt in porcinem Perikard

	n	Mittelwert ng/mg	SD ng/mg	Minimum ng/mg	Maximum ng/mg	Signifikanz (vs. Nativ)
Nativ	4	134,00	23,33	110	166	
Protokoll I	4	225,25	111,64	74	313	,063
Protokoll II	4	76,00	29,34	60	120	,344
Protokoll III	4	33,25	16,78	20	57	<b>,036</b>
Protokoll IV	4	13,50	5,26	9	21	<b>,011</b>
Protokoll V	4	12,25	8,22	3	21	<b>,010</b>

### 3.2.3 | Quantitative Protein-Bestimmung mittels Western Blot

#### 3.2.3.1 Alpha-Gal

Mit keinem der verwendeten Protokolle konnte eine vollständige Elimination von  $\alpha$ -Gal erreicht werden. Jedoch konnte mit einigen Protokollen immerhin eine signifikante Reduktion im Vergleich zum nativen Perikard erreicht werden. Dies ist bei porcinem Perikard der

Fall, welches mit Protokoll I ( $p=0,006$ ), II ( $p=0,001$ ), III ( $p=0,009$ ) und V ( $p=0,001$ ) behandelt wurde. Die höchste  $\alpha$ -Gal Reduktion erreicht Protokoll V mit einer Reduktion um 99,8% in porcinem Perikard. Eine signifikante Reduktion des  $\alpha$ -Gal Gehaltes konnte in den restlichen Probestrukturen nicht erreicht werden.

Abbildung 11 - Western Blot  $\alpha$ -Gal in bovinem Perikard

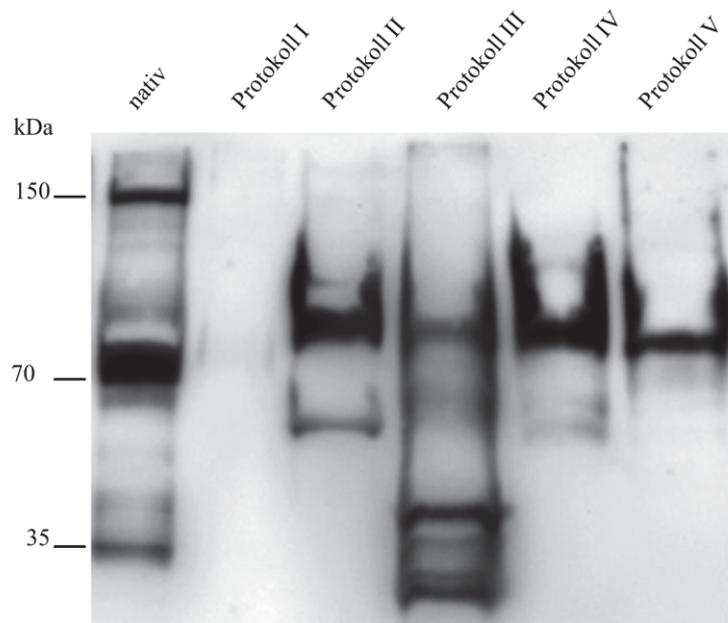
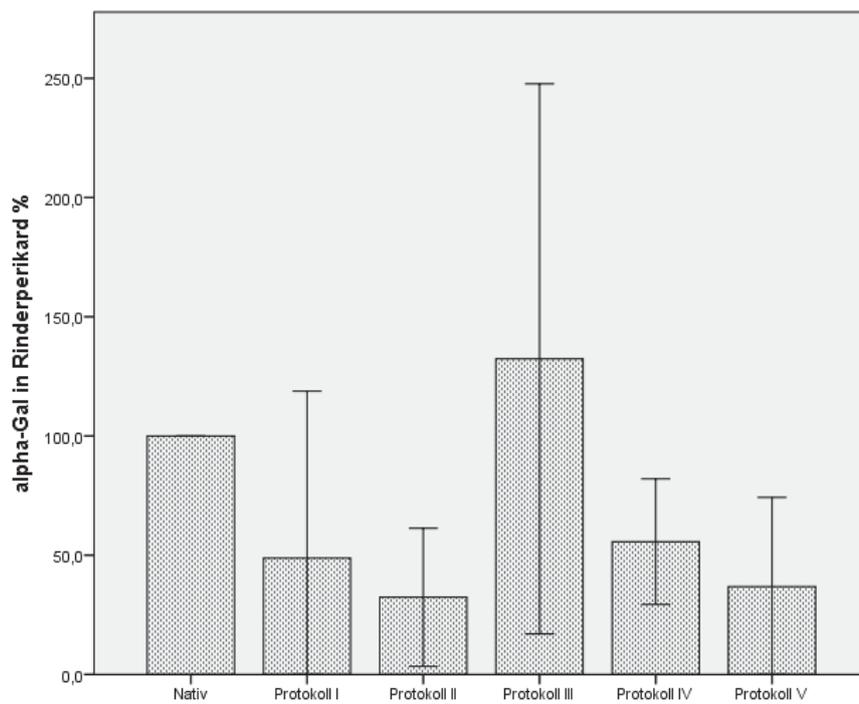
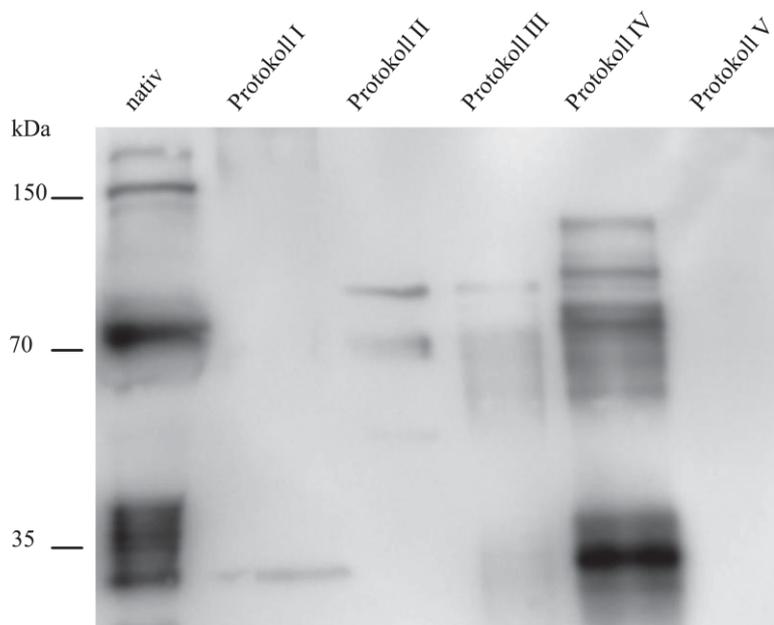
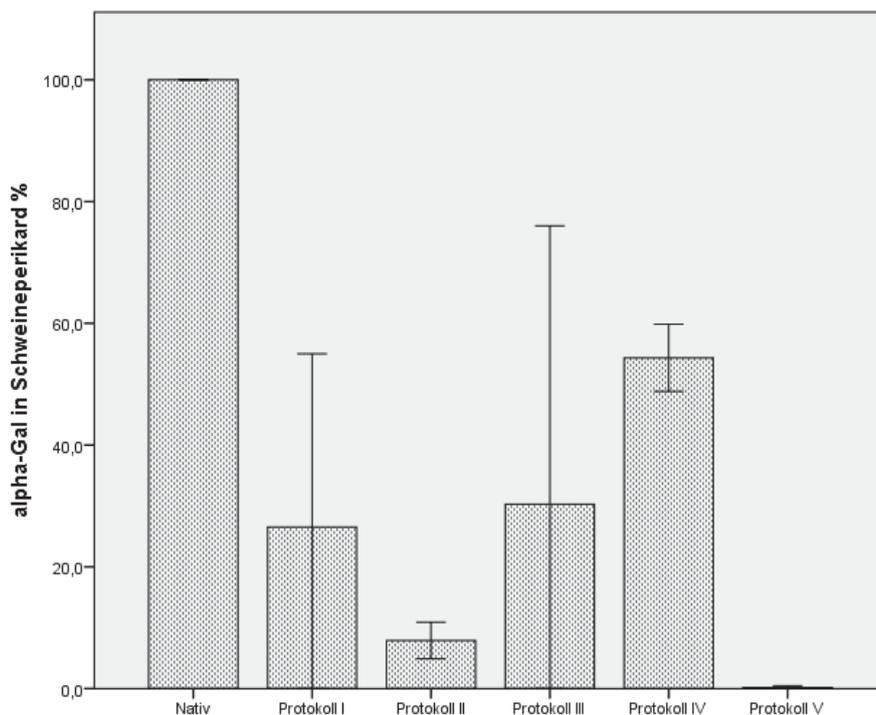
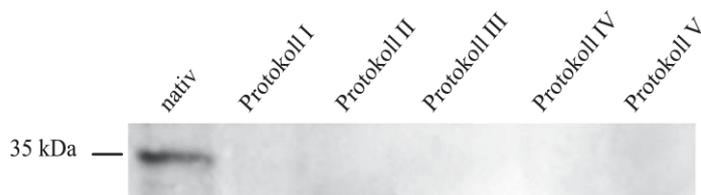
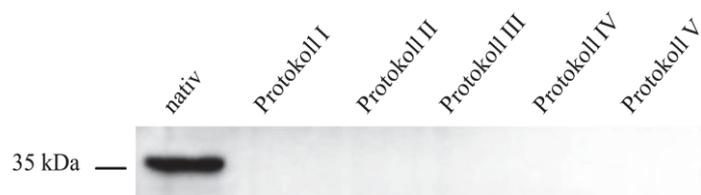


Diagramm 10 - Relativer  $\alpha$ -Gal-Gehalt in bovinem PerikardAbbildung 12 - Western Blot  $\alpha$ -Gal in porcine Perikard

**Diagramm 11 - Relativer  $\alpha$ -Gal-Gehalt in porcinem Perikard**

### 3.2.3.2 Osteopontin

In allen nativen Proben beider Spezies kann Osteopontin nachgewiesen werden. In allen dezellularisierten Perikardproben beider Spezies ist dieses Protein mittels Western Blot nicht mehr nachweisbar.

**Abbildung 13 - Western Blot Osteopontin in bovinem Perikard****Abbildung 14 - Western Blot Osteopontin in porcinem Perikard**

### 3.2.3.3 Kollagen Typ 1

In allen untersuchten Perikardproben kann Kollagen Typ 1 nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den RIPA-lysierten Proben führt die Lyse mit 8M Harnstoff in allen Gruppen zu höheren Messwerten. Aufgrund hoher Standardabweichungen und einem p-Wert  $>0,05$  wird die Zu- oder Abnahme des Kollagengehaltes in dezellularisierten Perikardproben im Vergleich zu nativen Proben als nicht signifikant gewertet. Allerdings muss hierbei betont werden, dass es auch nach mehrfachen Optimierungen des Verfahrens eine relevante Streuung der mittels Densitometrie bestimmten Proteinmengen gab.

Abbildung 15 - Western Blot Kollagen Typ 1 in RP (RIPA-Lysate)

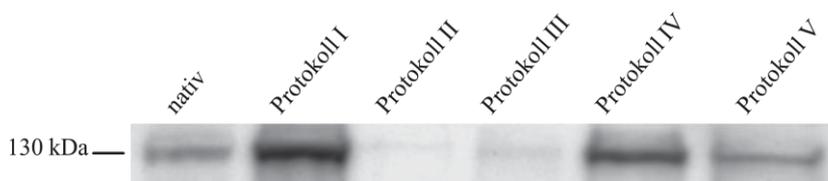


Diagramm 12 - Kollagen Typ 1: Relativer Gehalt in RP (RIPA-Lysate)

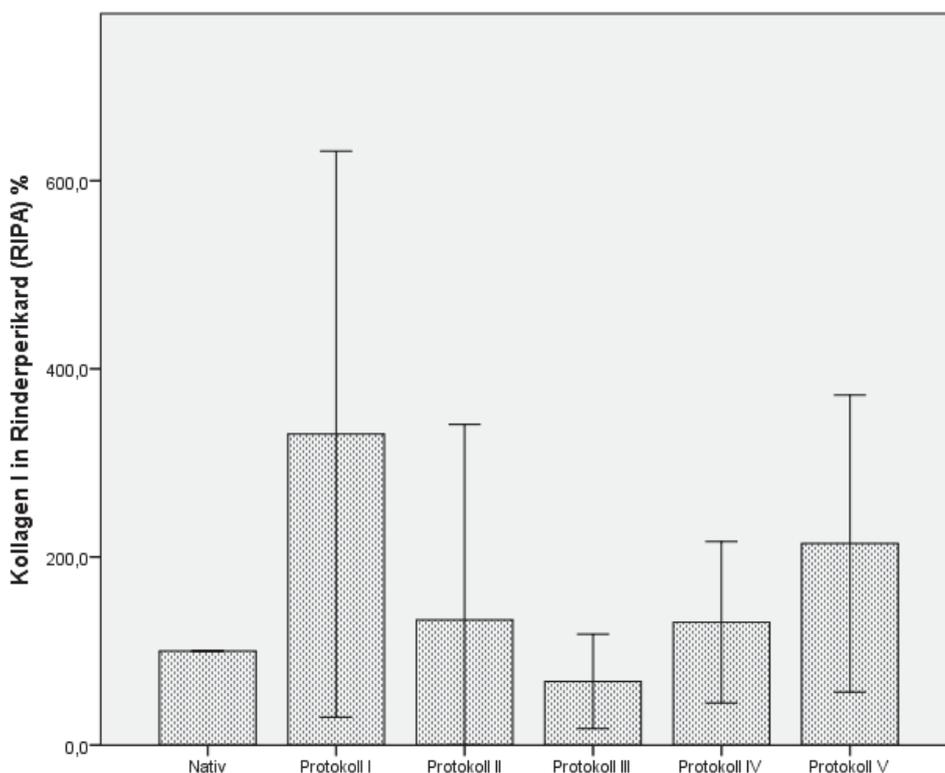


Abbildung 16 - Western Blot Kollagen Typ 1 in RP (Urea-Lysate)

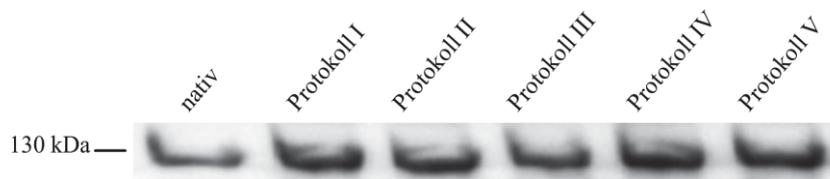


Diagramm 13 - Kollagen Typ 1 Relativer Gehalt (Urea-Lysate)

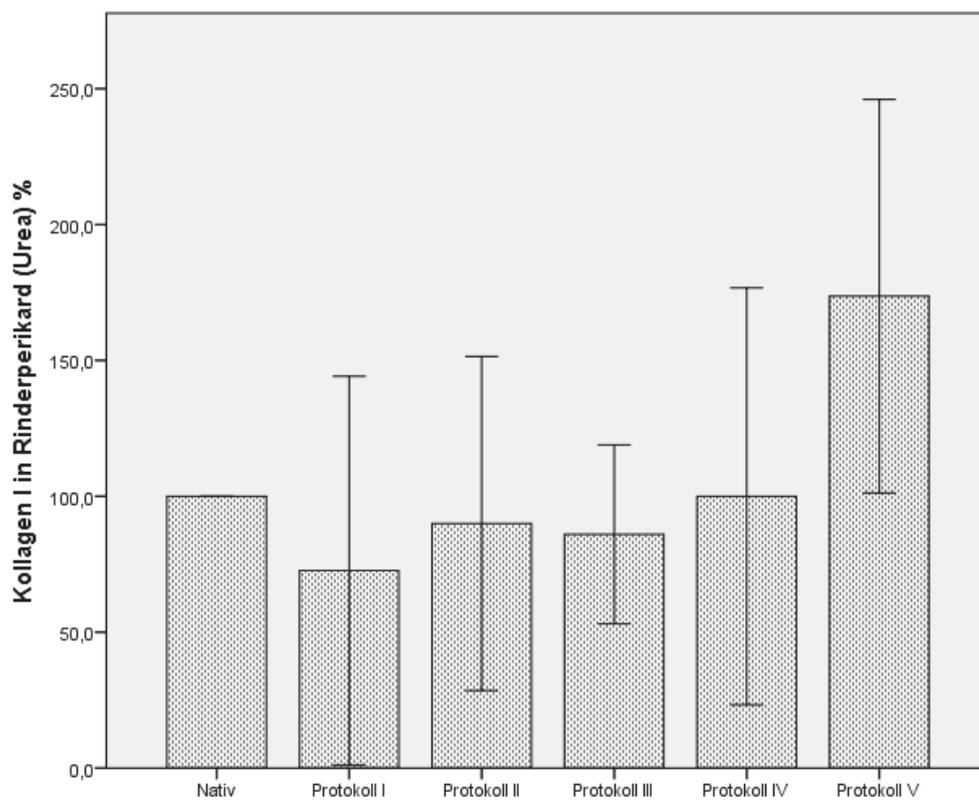


Abbildung 17 - Western Blot Kollagen Typ 1 in SP (RIPA-Lysate)

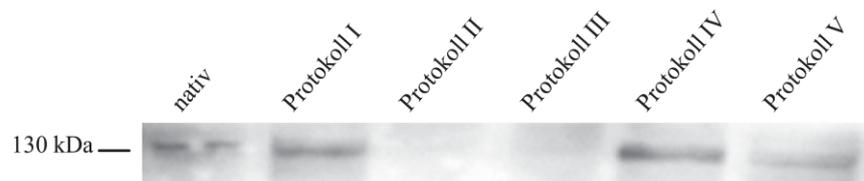


Diagramm 14 - Kollagen Typ 1: Relativer Gehalt in SP (RIPA-Lysate)

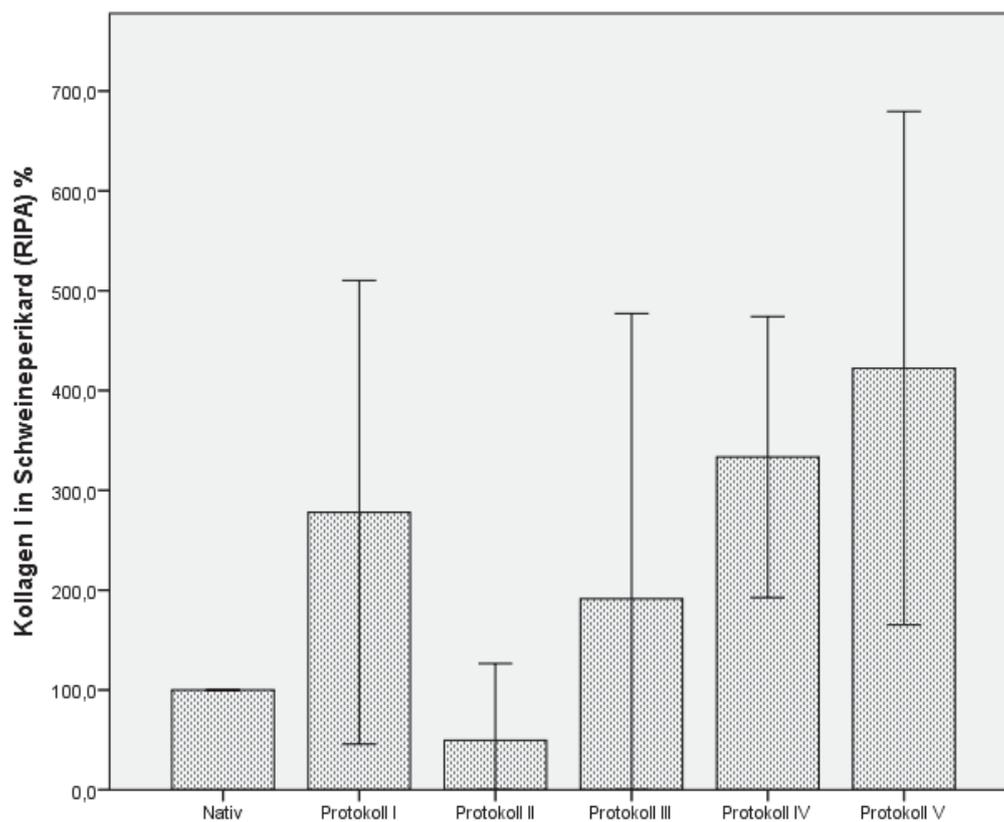


Abbildung 18 - Western Blot Kollagen Typ 1 in SP (Urea-Lysate)

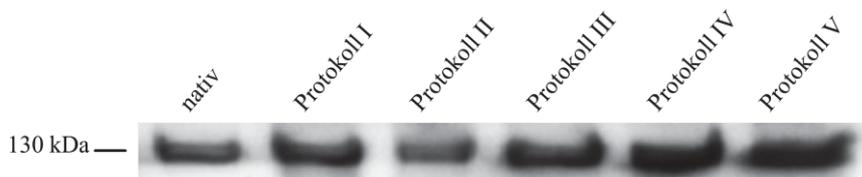
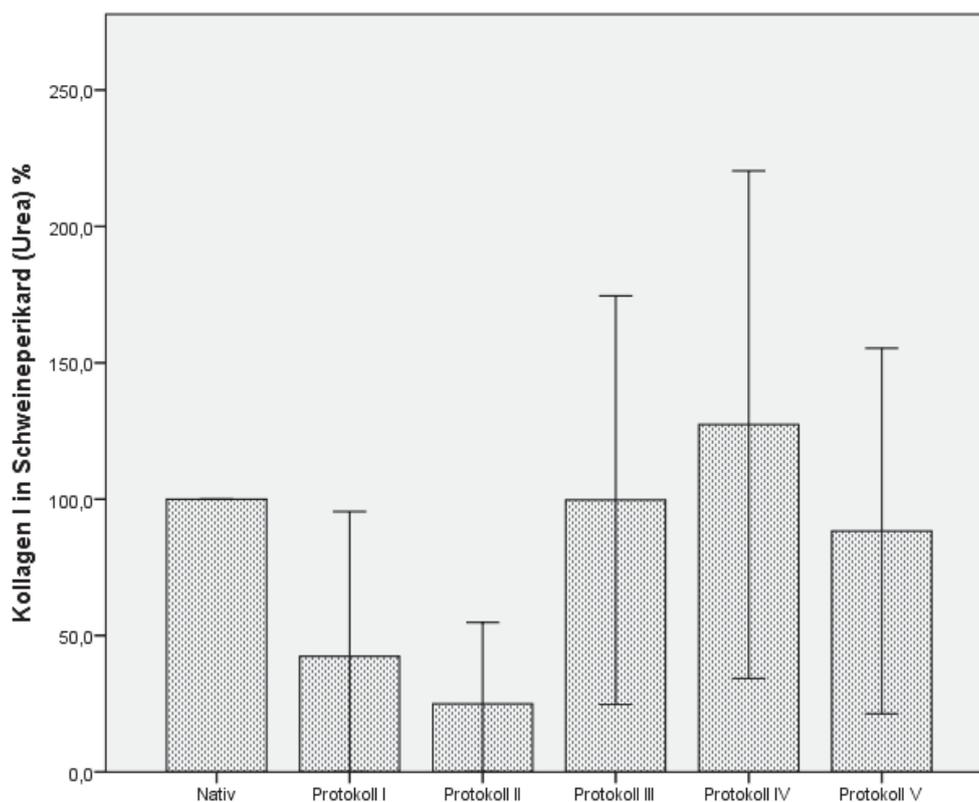


Diagramm 15 - Kollagen Typ 1: Relativer Gehalt in SP (Urea-Lysate)



### 3.3 | Biomechanische Eigenschaften

#### 3.3.1 | Elastische Energiedichte

Perikard beider Spezies welches mit Protokoll I und II behandelt wurde, weist eine Veränderung der Energiedichte im Vergleich zur nativen Kontrollgruppe auf. Dieses Ergebnis stellte sich jedoch nur für bovines Perikard als signifikant dar ( $p < 0,04$ ). Perikard beider Spezies zeigt nach einer Dezellularisierung mit den Protokollen III bis V eine nur geringe, nicht signifikante Veränderung der Energiedichte auf.

Diagramm 16 - Energiedichte in bovinem Perikard

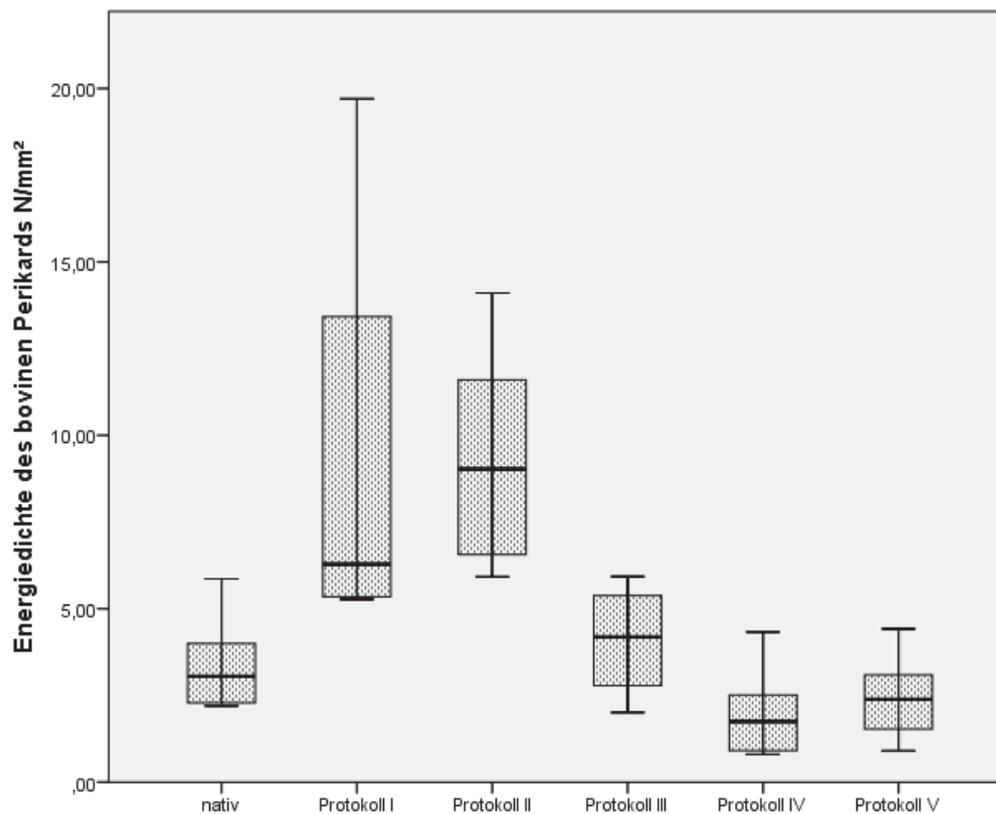


Tabelle 9 - Energiedichte in bovinem Perikard

	n	Mittelwert N/mm <sup>2</sup>	SD N/mm <sup>2</sup>	Minimum N/mm <sup>2</sup>	Maximum N/mm <sup>2</sup>	Signifikanz (vs. Nativ)
nativ	5	3,48	1,51	2,20	5,86	
Protokoll I	4	9,38	6,92	5,27	19,70	<b>,040</b>
Protokoll II	6	9,37	3,09	5,92	14,10	<b>,021</b>
Protokoll III	4	4,08	1,68	2,01	5,93	,999
Protokoll IV	5	2,06	1,44	,80	4,33	,925
Protokoll V	5	2,46	1,37	,90	4,42	,980

Diagramm 17 - Energiedichte in porcinem Perikard

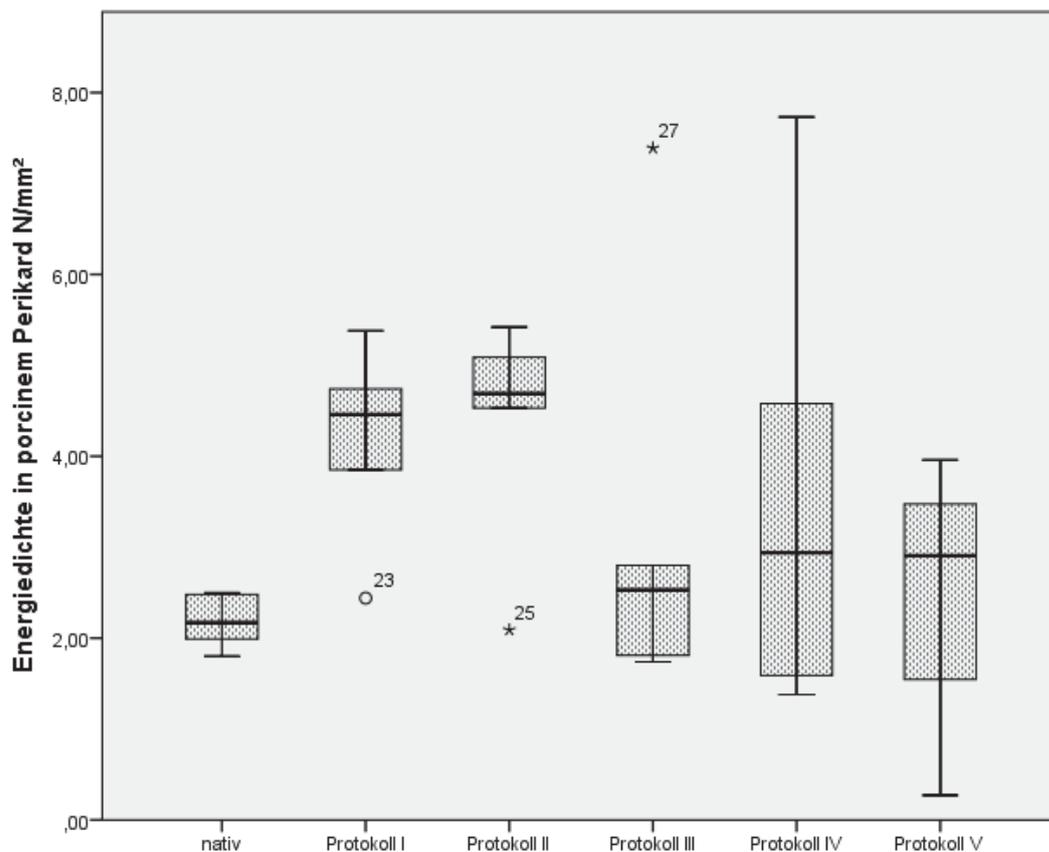
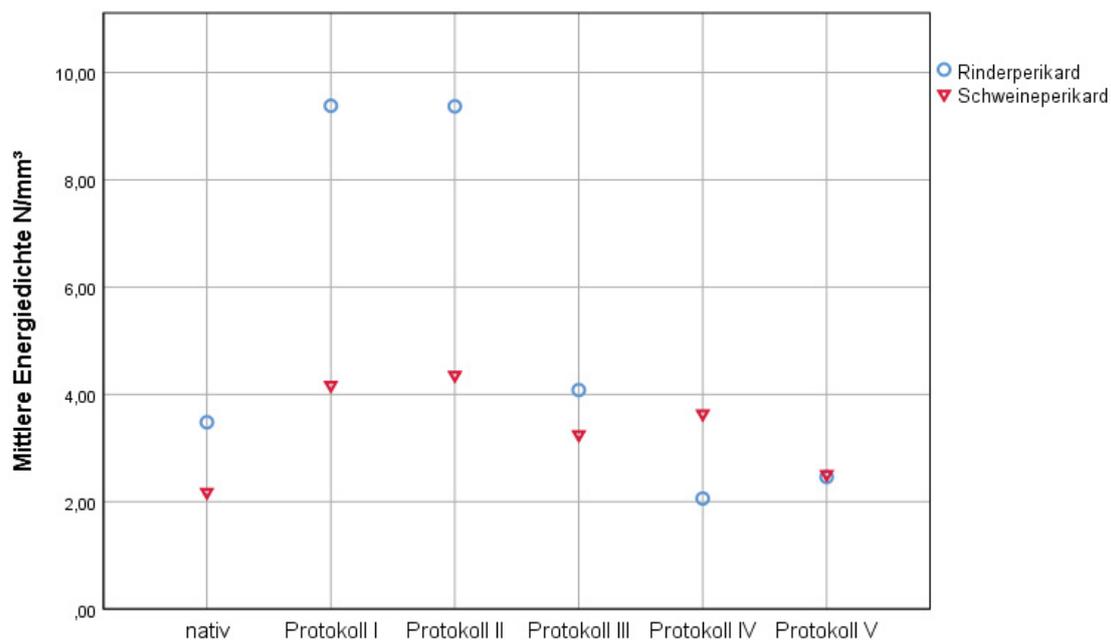


Tabelle 10- Energiedichte in porcinem Perikard

	n	Mittelwert N/mm <sup>2</sup>	SD N/mm <sup>2</sup>	Minimum N/mm <sup>2</sup>	Maximum N/mm <sup>2</sup>	Signifikanz (vs. Nativ)
nativ	5	2,18	,30	1,80	2,50	
Protokoll I	5	4,17	1,11	2,44	5,38	,279
Protokoll II	5	4,36	1,31	2,09	5,42	,208
Protokoll III	5	3,25	2,35	1,74	7,39	,796
Protokoll IV	5	3,64	2,61	1,38	7,73	,558
Protokoll V	4	2,51	1,57	,27	3,96	,999

Diagramm 18 – Mittlere Energiedichte in bovinem und porcinem Perikard



### 3.3.2 | Elastizitätsmodul

Die E-Modul-Werte der in dieser Arbeit untersuchten dezellularisierten Perikardproben zeigen keine signifikante Abweichung von den Werten der nativen Kontrollproben auf. Weiterhin kann festgestellt werden, dass die E-Module von nativem bovinem Perikard höhere Werte aufweisen als die des nativen porcinen Perikards.

Diagramm 19 – E-Modul des bovinen Perikards

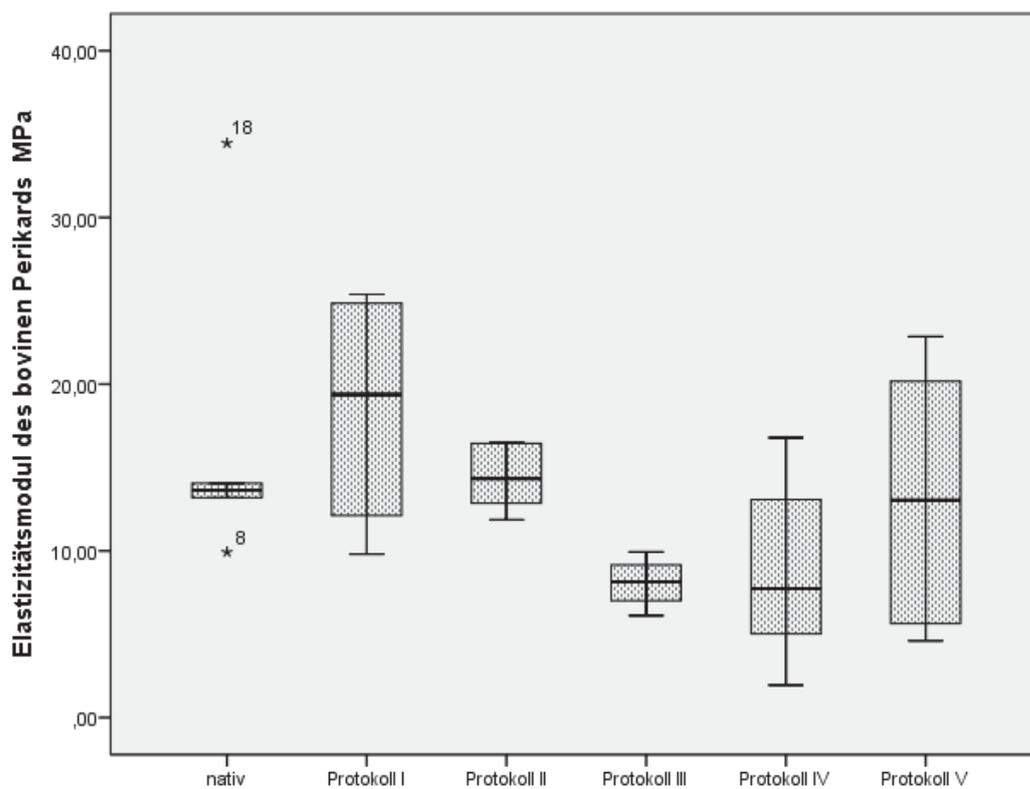


Tabelle 11- E- Modul des bovinen Perikards

	n	Mittelwert MPa	SD MPa	Minimum MPa	Maximum MPa	Signifikanz (vs. Nativ)
nativ	5	17,05	9,86	9,92	34,45	
Protokoll I	4	18,48	7,60	9,81	25,38	,998
Protokoll II	6	14,39	1,87	11,87	16,53	,944
Protokoll III	4	8,08	1,56	6,12	9,93	,193
Protokoll IV	5	8,91	6,00	1,95	16,79	,221
Protokoll V	5	13,26	8,26	4,60	22,86	,834

Diagramm 20- E-Modul des porcinen Perikards

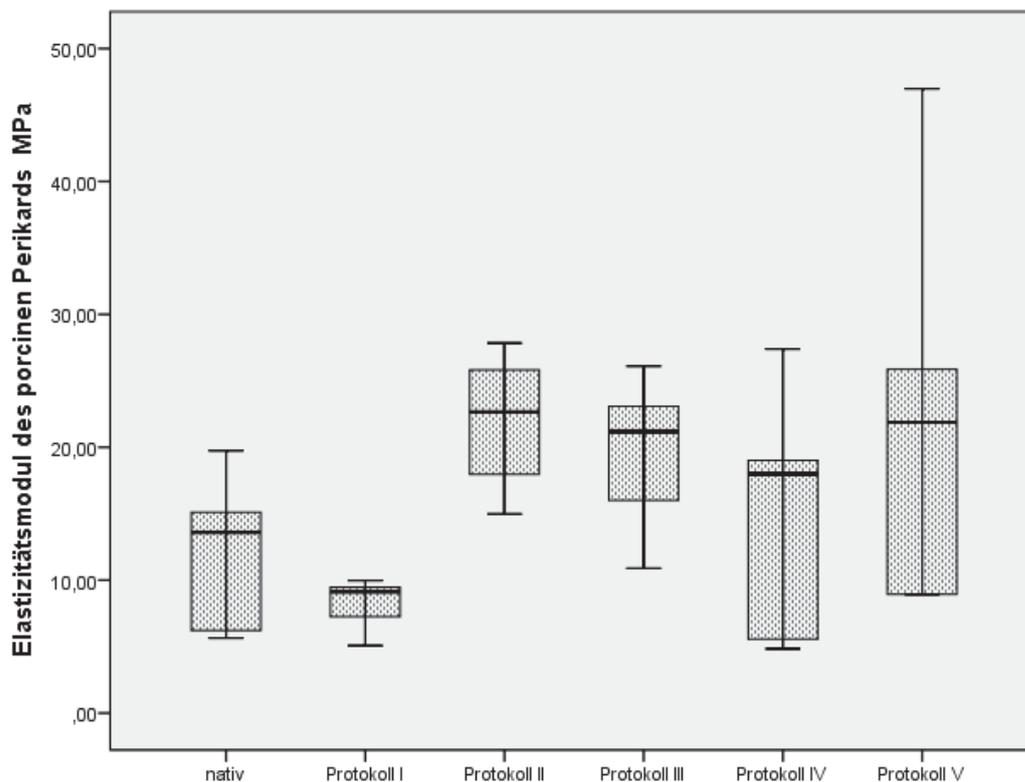
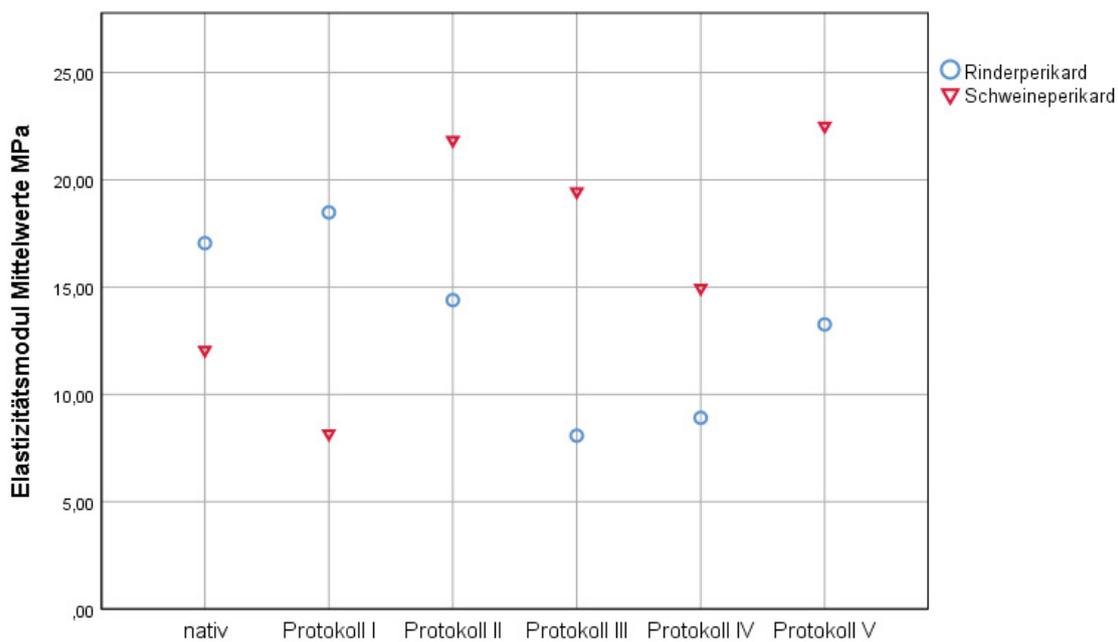


Tabelle 12 - E- Modul des porcinen Perikards

	n	Mittelwert MPa	SD MPa	Minimum MPa	Maximum MPa	Signifikanz (vs. Nativ)
nativ	5	12,06	6,04	5,65	19,75	
Protokoll I	5	8,17	2,01	5,07	9,97	,924
Protokoll II	5	21,85	5,35	14,98	27,84	,279
Protokoll III	5	19,45	6,02	10,90	26,10	,531
Protokoll IV	5	14,96	9,63	4,84	27,40	,976
Protokoll V	5	22,51	15,64	8,92	46,97	,227

Diagramm 21 – Mittlere Werte des Elastizitätsmoduls des bovinen vs. des porcinen Perikards



### 3.3.3 | Gewebedicke

Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der Gewebedicke, bei bovinem Perikard, welches mit Protokoll III behandelt wurde ( $p=0,000$ ). In den restlichen Gruppen kam es zu keiner signifikanten Zunahme der Gewebedicke durch Dezellularisierung.

Diagramm 22 - Dicke des bovinen Perikards

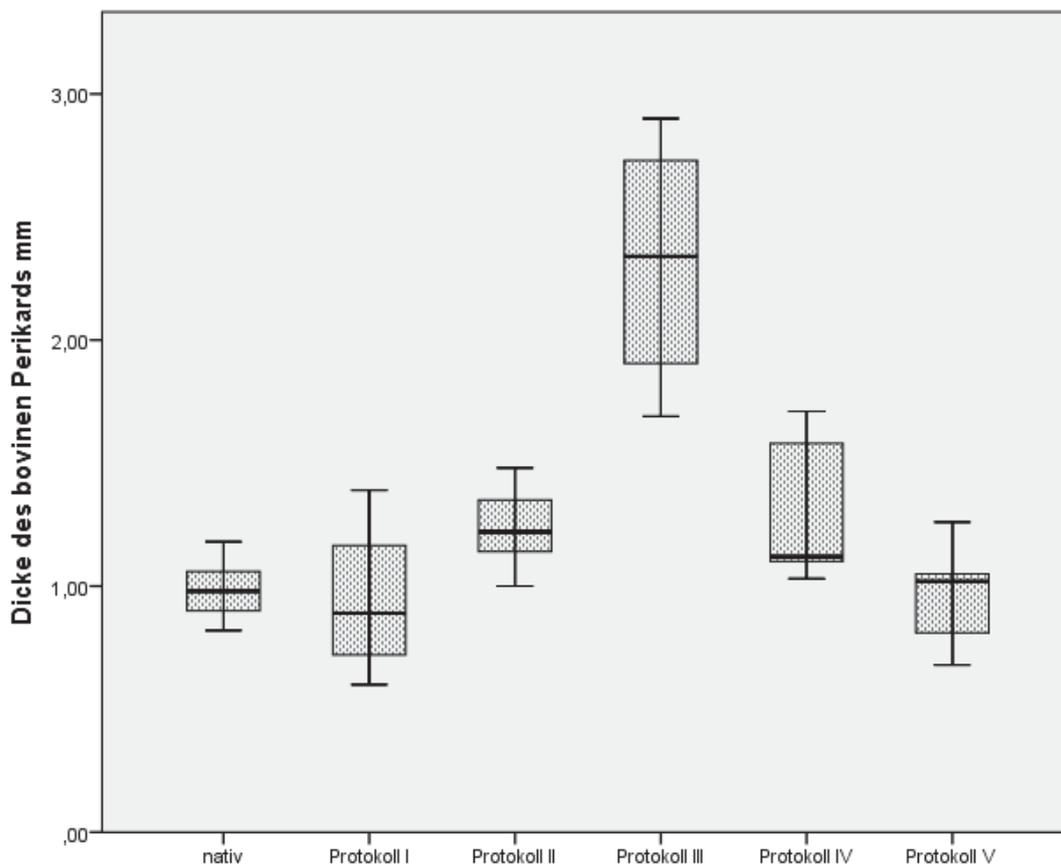


Tabelle 13 - Dicke des bovinen Perikards

	n	Mittelwert mm	SD mm	Minimum mm	Maximum mm	Signifikanz (vs. Nativ)
nativ	5	,98	,13	,82	1,18	
Protokoll I	4	,94	,33	,60	1,39	,999
Protokoll II	6	1,23	,17	1,00	1,48	,515
Protokoll III	4	2,31	,52	1,69	2,90	<b>,000</b>
Protokoll IV	5	1,30	,31	1,03	1,71	.319
Protokoll V	5	,96	,22	,68	1,26	1,000

Diagramm 23 - Dicke des porcinen Perikards

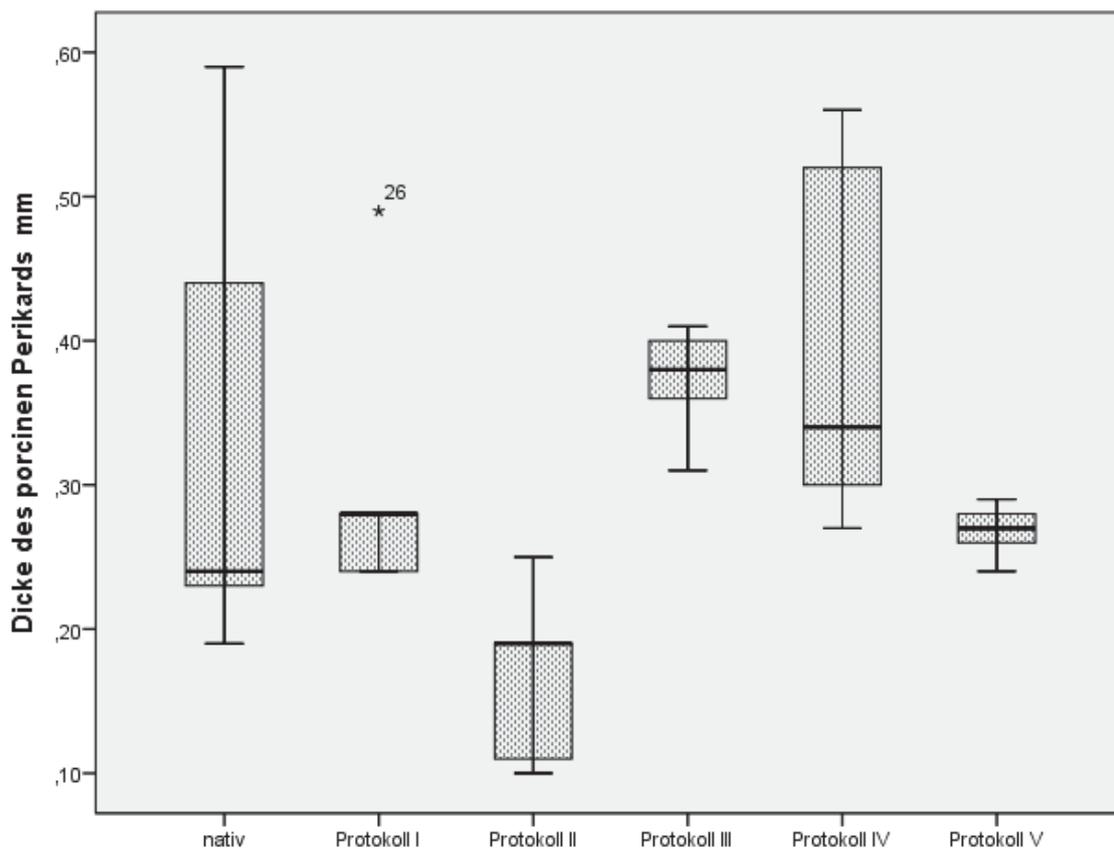
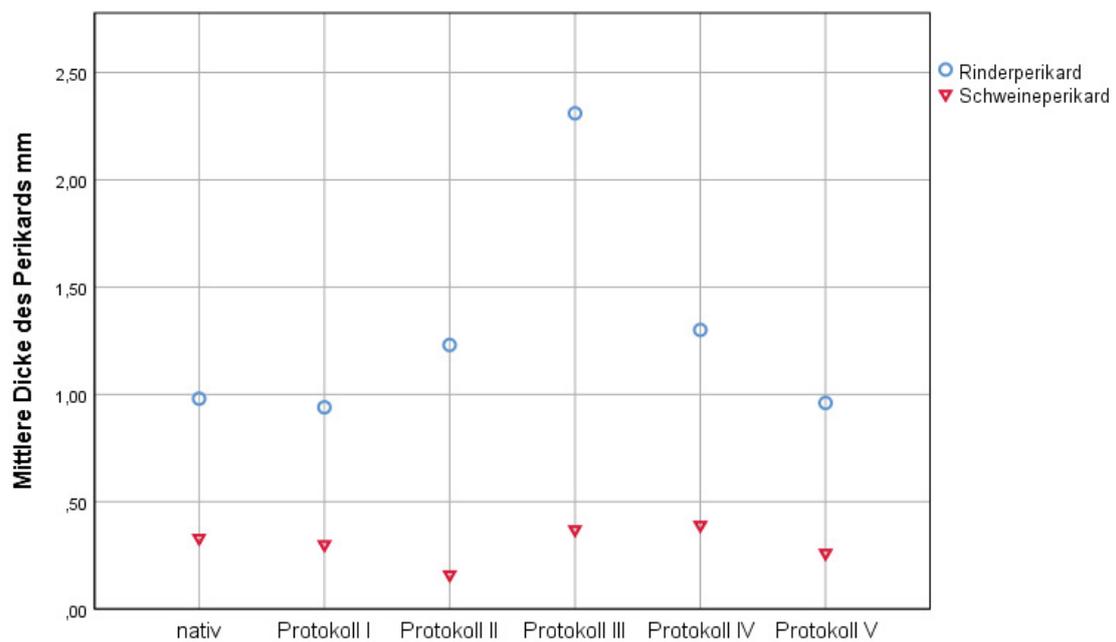


Tabelle 14 - Dicke des porcinen Perikards

	n	Mittelwert mm	SD mm	Minimum mm	Maximum mm	Signifikanz (vs. Nativ)
nativ	5	,33	,17	,19	,59	
Protokoll I	5	,30	,10	,24	,49	,980
Protokoll II	5	,16	,06	,10	,25	<b>,047</b>
Protokoll III	5	,37	,03	,31	,41	,974
Protokoll IV	5	,39	,13	,27	,56	,823
Protokoll V	5	,26	,01	,24	,29	,726

Diagramm 24 – Mittlere Werte der Dicke des bovinen vs. des porcinen Perikards



---

## 4 | Diskussion

### 4.1 | Diskussion der Methoden

#### 4.1.1 | Präparation

Die einzelnen Herzbeutel weisen unterschiedliche Faserorientierungen auf, dabei ist die Präparation in axiale Streifen bisher nur ein Versuch die Proben möglichst weitgehend zu standardisieren. Aus mikroanatomischer Sicht kann nicht davon ausgegangen werden, dass dadurch die Faserorientierung in allen axialen Streifen gleich ist. Dies ist auch nicht erstrebenswert, da die mechanische Stabilität der Proben in allen Richtungen der Faserorientierung gegeben sein sollte. Die geringe Signifikanz der erlangten Ergebnisse der biomechanischen Testung lässt sich möglicherweise nicht nur auf ein Problem der standardisierten Probenpräparation, sondern unter Umständen auch auf die niedrigen Gruppengrößen zurückführen. Eine erheblich höhere n-Zahl würde ein aussagekräftigeres Ergebnis liefern. Dennoch ist aus den erbrachten Ergebnissen eine Einordnung der Wertigkeit der unterschiedlichen Behandlungen abzuleiten.

#### 4.1.2 | Dezellularisierung

Das Inkubieren der Perikardproben in 250ml Vierkantflaschen unter ständigem Schwenken hat sich bei Tschierschke et al. (Tschierschke R., 2010) als effektive physikalische Methode erwiesen. Sie ermöglicht eine gleichmäßige Verteilung der Dezellularisierungslösung im Gewebe, weshalb in der vorliegenden Arbeit keine Änderung der Methode vollzogen wurde.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Reagenzien dienten laut vorliegenden Veröffentlichungen verschiedenen Forschungsgruppen als effektive Dezellularisierungsmittel. Das in Protokoll I, IV und V verwendete nicht-ionische Detergenz Triton X-100, welches Protein-DNA-, Protein-Lipid- und Lipid-Lipid-Bindungen trennt, zeigte in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit von der Gewebedicke. Glycerin, welches in Protokoll I eingesetzt wird, ist ein Alkohol welches durch Dehydratation zur Zellyse führt und Lipide löst und entfernt (Crapo P. M., 2011). Die ionischen Detergenzien SDS und DCA, welche in allen Protokollen bis auf Protokoll III eingesetzt wurden, lieferten in mehreren Studien gute Dezellularisierungsergebnisse. Insbesondere SDS gilt als ein potentes Detergenz, welches in der Lage ist, durch Auflösung von Zell- und Kernmembranen Zellkernreste und zytoplasmatische Proteine auch aus dichtem Gewebe effektiv zu entfernen. Das in Protokoll III eingesetzte Trypsin, welches die Peptidverbindung zwischen der C-Seite

---

von Arginin und Lysin spaltet, konnte sich ebenfalls als effektives Dezellularisierungsmittel etablieren. Die Kombination von Trypsin mit dem Chelatbildner und Metallproteaseinhibitor EDTA ist ebenfalls üblich. Die in Protokoll IV und V eingesetzten Nukleasen, welche die Hydrolyse von Desoxyribonukleasen bzw. Ribonukleasen katalysieren, werden typischerweise der Behandlung mit Detergenzien hinzugefügt, wenn eine Azellularität mit Detergenzien alleine nicht erreicht werden kann. In vorangegangenen Studien konnte dadurch eine effektive Dezellularisierung erreicht werden, jedoch konnten die schwer zu entfernenden Rückstände von DNasen und RNasen in transplantiertem Gewebe Immunreaktionen auslösen. (Keane T. J., 2015) (Crapo P. M., 2011) (Yang M., 2009)

### **4.1.3 | Proteinanalysen**

Die in dieser Arbeit durchgeführte Proteinanalyse basierte auf semiquantitative Verfahren. Mit Hilfe der Spektrophotometrie konnte eine Aussage über die Veränderung des Kollagenanteils im dezellularisierten Perikard im Vergleich zum nativen Perikard getroffen werden. Aus diesem Ergebnis wiederum konnte geschlossen werden, wie stark die einzelnen Dezellularisierungsverfahren zu einem Verlust an nicht-kollagenen Proteinen führen. Durch die Methode des Western Blots konnten spezifisch Antigene nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich jedoch ebenfalls um ein semiquantitatives Verfahren. Um eine Aussage über die Quantität der noch vorhandenen Antigene nach Dezellularisierung treffen zu können, sollten zusätzlich oder stattdessen quantitative Analysemethoden wie z.B. ELISA gewählt werden. Optimierungsbedarf besteht zudem in der Methode der Perikardlyse (d.h. der Lysierung der im Perikard enthaltenen Proteine), da die in dieser Arbeit gewählte Methode keine vollständige Lyse der einzelnen Proben erreichen konnte.

### **4.1.4 | Biomechanische Testung**

Die Spannungs-Dehnungs-Diagramme des untersuchten Perikards weisen keine signifikanten linearen Steigungen auf, die für eine eindeutige Vergleichbarkeit notwendig wären. Daher wurde zur Ermittlung des E-Moduls in der vorliegenden Arbeit als Näherung die durchschnittliche Steigung der Kurve im Bereich der gültigen Dehnung bis zum Riss verwendet. Hierbei sollte jedoch beachtet werden, dass es sich um kein reales E-Modul handelt, sondern um eine Vereinfachung, welche eine statistische Vergleichbarkeit der Perikardproben untereinander ermöglicht.

---

## 4.2 | Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 | Antigenreduktion

Eines der Hauptziele eines Dezellularisierungsprotokolls sollte es sein, möglichst alle zellulären und nukleären Bestandteile aus dem Gewebe zu entfernen (Gilbert T. W., 2006).

Akhyari et al. konnten zeigen, dass in mit Protokoll I behandelten ovinen Aortenklappen, histologisch minimale Zellreste nachweisbar sind. (Akhyari P., 2010) Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis der in dieser Arbeit erfolgten Dezellularisierung von bovinem und porcinem Perikard. Das Vorhandensein von Zellkernfragmenten im Gewebe spricht für eine subtotale Wirkung der eingesetzten Detergenzien. Eine mögliche weitere Erklärung hierfür ist die verhältnismäßig kurze Waschphase von nur 2 Tagen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lichtenberg et al., welche eine vollständige Azellularität der mit Protokoll II behandelten ovinen Pulmonalklappen zeigten, wies das in dieser Arbeit mit demselben Protokoll behandelte Perikard eine unvollständige DNA-Entfernung auf. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass die Gewebebeschaffenheit im Falle vom Perikard deutlich von derjenigen der Pulmonalklappen abweicht, wodurch alleine bereits die unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären sind.

Ähnlich verhielt es sich mit dem Protokoll III. Cebotari et al. konnten zeigen, dass die mit diesem Protokoll behandelten humanen Herzklappen histologisch zellfrei waren, und eine über 98%ige DNA-Reduktion erreicht werden konnte. (Cebotari S., 2006) Das in der vorliegenden Arbeit mit demselben Protokoll behandelte Perikard zeigt jedoch sowohl histologisch als auch molekularbiologisch eine unzureichende Azellularität. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass Perikard dicker und kompakter als Herzklappengewebe ist und es daher höherer Detergenz-Konzentrationen bzw. einer längeren Behandlungsdauer bedarf, um eine ähnlich vollständige Zellfreiheit zu erreichen. Diese Ergebnisse decken sich mit der in der Literatur beschriebenen Feststellung, dass eine vollständige Eliminierung von Zellresten durch bisherige Dezellularisierungsprozesse nicht möglich ist, und es kein universelles Protokoll gibt, welches an unterschiedlichen Geweben gleichermaßen angewendet dieselben Ergebnisse erzielen kann. Die spezifischen Eigenschaften der einzelnen Gewebe verlangen ein Dezellularisierungsprotokoll, welches speziell daran angepasst sein muss. (Keane T. J., 2015)

Die Ergebnisse des mit Protokoll IV behandelten Perikards decken sich größtenteils mit den Ergebnissen von Rieder et al. die zeigen konnten, dass nach der Behandlung mit dem Protokoll porcine und humane Pulmunalklappen histologisch zellfrei waren. Bovines und

---

porcines Perikard war in dieser Arbeit histologisch ebenfalls zellfrei, jedoch war molekularbiologisch DNA nachweisbar.

Tedder et al. haben das Protokoll V an porcinem Perikard angewendet und konnten eine vollständige Azellularität auf histologischer Ebene sowie eine DNA-Reduktion von 94% erreichen. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl an bovinem als auch an porcinem Perikard reproduziert werden. Nach den Kriterien einer erfolgreichen Dezellularisierung konnten somit Protokoll IV und V bei Perikard beider untersuchter Spezies eine befriedigende DNA-Reduktion erreichen. Eine vollständige Befreiung von DNA konnte allerdings keines der angewendeten Dezellularisierungsverfahren erreichen. Erwähnenswert ist, dass in vielen kommerziell erhältlichen ECM-Gerüsten DNA-Spuren gemessen werden konnten, und dass diese Materialien sich dennoch im klinischen Alltag als erfolgreich erwiesen haben, sodass dem Vorhandensein geringer DNA-Mengen keine allzu große Relevanz hinsichtlich der Induktion klinisch relevanter Immunreaktionen zugeschrieben werden sollte. (Gilbert T. W., 2009)

Zwar wurde von Badylak et al. der DNA-Gehalt des Gewebes als Marker für eine ausreichende Dezellularisierung ausgewählt, jedoch spielen auch andere Antigene eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Immunreaktionen nach Transplantation von xenogenem Material. Zu diesen Antigenen zählt insbesondere das Oligosaccharid  $\alpha$ -Gal. Dieses Epitop wurde in hohen Mengen als Zelloberflächenmolekül in den meisten Spezies gefunden. Eine Ausnahme bildet neben Altweltaffen der Mensch, bei dem das Epitop aufgrund von Mutationen nicht gebildet wird. Stattdessen bildet der Mensch als Folge der ständigen Exposition mit Darmbakterien, welche das Epitop jedoch tragen, große Mengen  $\alpha$ -Gal-Antikörper. Dies ist die primäre Ursache für die Abstoßungsreaktion bei Xenotransplantation. (Galili U., 1987) Daher ist es von Bedeutung, dass eine vollständige Entfernung dieses Epitops aus dem xenogenen Gewebe erreicht wird, bevor ein solches Gewebe als Gerüst für ein tissue engineered Transplantat dienen kann. Dies gelang in dieser Arbeit nur in porcinen Perikardproben welche mit Protokoll V behandelt wurden. In allen anderen Gruppen konnte das alpha-Gal-Epitop auch nach der Dezellularisierungsbehandlung nachgewiesen werden. Für dieses Problem kann als Lösungskonzept die gezielte enzymatische Entfernung von Xenoantigenen ansetzen. Die in der Literatur beschriebene gezielte Behandlung des Perikards mit dem Enzym alpha-Galaktosidase konnte eine vollständige Eliminierung des Epitops erzielen. Ein Vorteil dieser gezielten enzymatischen Entfernung von Xenoantigenen ist, dass es zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der strukturellen oder

biologischen Eigenschaften des Gewebes kommen soll (lt. entsprechenden Veröffentlichungen). (Goncalves A. C., 2005)

#### 4.2.2 | Erhalt der strukturellen ECM-Eigenschaften

Neben der effektiven Entfernung aller zellulären Bestandteile, ist das Ziel eines Dezellularisierungsprotokolls die Beeinträchtigung der bindegewebigen Integrität minimal zu halten. (Gilbert T. W., 2006)

Akhyari et al. konnten zeigen, dass die dreidimensionale Struktur von mit Protokoll I behandelten ovinen Aortenklappen histologisch gut erhalten war. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnis. Die in diesem Protokoll verwendeten nicht-ionischen Detergenzien SDS und DCA zeigten in früheren Studien nachweislich die Tendenz, die Ultrastruktur zu zerstören, GAG zu entfernen und Kollagen zu schädigen. (Crapo P. M., 2011) Eine mögliche Erklärung für den geringen Strukturverlust ist jene, dass Glycerol ein proteinstabilisierender Alkohol ist. (Timasheff S., 1993)

Einen guten Erhalt der ECM auf histologischer Ebene zeigte auch Perikard, welches mit Protokoll II behandelt wurde. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen bereits Lichtenberg et al. bei der Anwendung des Protokolls an ovinen Pulmonalklappen. Da auch hier die denaturierenden Detergenzien DCA und SDS angewendet wurden, ist die kurze Dauer des Protokolls eine mögliche Erklärung für die geringe Schädigung der ECM.

Protokoll III zeigte in der Studie von Cebatori et al. an humanen Herzklappen ebenfalls eine histologisch gut erhaltene ECM-Struktur. (Cebotari S., 2006) Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit an bovinem und porcinem Perikard nicht reproduziert werden. Bereits Hülsmann et al. beobachteten, dass mit Protokoll III behandeltes bovines Perikard eine aufgequollene ECM-Struktur aufwies. (Hülsmann J., 2012) Zum selben Ergebnis gelangten Tschierschke et al. welche Protokoll III an ovinen Aortenklappen anwendeten. (Tschierschke R., 2010) Steinhoff et al. Konnten allerdings im Rahmen von Zellkulturversuchen nachweisen, dass mit diesem Protokoll behandelte porcine Pulmonalklappen erfolgreich mit autologen Zellen rebesiedelt werden können, und somit zeigen, dass zumindest die grundsätzliche in vitro Biokompatibilität gegeben ist. (Steinhoff G., 2000)

Rieder et al., welche Protokoll IV an porcinen und humanen Herzklappen anwendeten, konnten zeigen, dass die histologische Kollagen- und Elastinbeschaffenheit des Gewebes erhalten bleibt. (Rieder E., 2005) Im Gegensatz dazu zeigte sich in dieser Arbeit bei mit Protokoll IV behandeltem Perikard histologisch eine deutliche Lockerung des Kollagenfaserverbandes. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der kombinierte Einsatz der ECM-

schädigenden Detergenzien DCA und IGEPAL, sowie Triton X-100, welches je nach Gewebeat die ECM schädigt und GAG entfernt. (Crapo P. M., 2011) Die partiellen Unterschiede der Ergebnisse zwischen dieser Arbeit und jener Veröffentlichung von Rieder et al. mag jedoch auch wieder durch die unterschiedlichen Gewebeatarten (Herzklappen versus Perikard) begründet sein.

Das Protokoll V, welches von Tedder et al. zur Dezellularisierung von porcinem Perikard entwickelt wurde, führte trotz Einsatz von DCA und Triton-X100 auch in dieser Arbeit sowohl an porcinem als auch an bovinem Perikard zu einem histologisch intakten Kollagenfaserverband. Es ist davon auszugehen, dass die hier eingesetzten Pufferlösungen einen protektiven Effekt auf die kollagene ECM bewirken. Glykosaminoglykane waren jedoch nachweislich stark reduziert, was einer relevanten Beeinträchtigung der Integrität der ECM gleichzusetzen ist.

Die in der spektrophotometrischen semiquantitativen Kollagenbestimmung festgestellte Zunahme des relativen Kollagengehaltes in allen dezellularisierten Proben im Vergleich zu den nativen Proben, kann dadurch erklärt werden, dass es durch die Dezellularisierungsverfahren zu einer Abnahme nicht-kollagener Proteine kommt. Die Tatsache, dass in den histologischen Schnitten, die mit Direktrot und Fast Green eingefärbt sind, die dezellularisierten Proben grünlicher erscheinen widerspricht jedoch vordergründig diesem Ergebnis. Eine Erklärung hierfür ist, dass Bereiche des nativen Kollagens durch die Dezellularisierungsverfahren strukturelle Schädigungen erfahren, sodass diese als „nicht-kollagene“ Proteine grün gefärbt werden. Eine weitere Erklärung ist, dass es durch die Dezellularisierung zu einer Auflockerung des Gewebes kommt und somit nicht-kollagene Bereiche optisch sichtbarer werden. Letztere Erklärung ist vor allem deshalb schlüssig, da es sich bei den o.g. Verfahren um dieselbe Färbungskombination mit lediglich zwei unterschiedlichen Detektionsverfahren handelt.

### **4.2.3 | Erhalt der mechanischen Integrität**

Die Energiedichte definiert als Energie je Volumeneinheit (Hering E., 1995) entspricht dem elastischen Potential, welches im Gewebe enthalten ist, bevor es zur Schädigung der strukturellen Integrität kommt. (Tschierschke R., 2010) Die erhöhte Energiedichte in mit Protokoll I behandeltem bovinem Perikard lässt sich möglicherweise auf den Einsatz von Glycerol zurückführen, welches dem Gewebe durch stärkere Hydratisierung mehr Stabilität verleiht. (Timasheff S., 1993) Im Falle von porcinem Perikard kam es jedoch zu keiner signifikant erhöhten Energiedichte. Vermutlich lässt sich dies auf die deutlich geringere

Gewebedicke des Schweineperikards zurückführen, da in diesem Fall eine bessere Auswaschung des Glycerols stattfinden kann.

Das E-Modul wiederum beschreibt die Spannungsänderung bezogen auf die Dehnungsänderung, (Hering E., 1995) also wie sehr sich ein Material einer dauerhaften Verformung widersetzt, was der Elastizität entspricht. Die Werte der E-Module zeigen, dass die verschiedenen Dezellularisierungsverfahren keine wesentliche Beeinträchtigung der Elastizität herbeiführen. Dies widerspricht den histologischen Ergebnissen der ECM Analyse, in denen Protokoll III und IV zu einer Schädigung des Bindegewebsverbandes. Eine Erklärung hierfür liefern Courtmann et al. Sie gehen davon aus, dass die mechanische Integrität des Perikards nach Dezellularisierung nicht nur mit dem Ausmaß der Denaturierung der Kollagenfasern korreliert, sondern wesentlich mit dem Verlust an Substanzen wie Proteoglykanen verbunden ist. In dieser Arbeit kam es zwar durch nahezu alle Dezellularisierungsverfahren zu einer Abnahme des Gehaltes an Glukosaminoglykanen, jedoch kann davon ausgegangen werden dass es sich bei diesen entfernten GAGs um freie Proteoglykane handelt, deren Entfernung aus dem Gewebe in Studien zu keiner Beeinträchtigung des elastischen Verhaltens führte. Vielmehr ist es das fest an die Kollagenfasern gebundene Proteoglykan Dermatansulfat, welches die mechanischen Eigenschaften bestimmt. (Courtman D. W., 1994) (Simionescu D., 1989) Möglicherweise handelt es sich also bei dem in dieser Arbeit nach Dezellularisierung weiterhin nachweisbare GAG um eben dieses für den Erhalt der elastischen Eigenschaften relevante Dermatansulfat. Dies ist jedoch eine Hypothese, die durch zukünftige Analysen validiert werden sollte.

Die höheren E-Modul Werte der bovinen Perikardproben im Vergleich mit den porcinen konnten schon Gauvin et al (44) feststellen. (Gauvin R., 2012) Dennoch werden zunehmend Transkatheterherzklappen aus porcinem Perikard hergestellt und klinisch eingesetzt. (Kheradvar A., 2014) Ob hierbei eine Relevanz für die Funktion und Haltbarkeit dieser Prothesen abzuleiten ist, bleibt Langzeit-Beobachtungen an den entsprechend behandelten Patienten vorbehalten.

### **4.3 | Eignung als Matrix für tissue engineerter Herzklappen**

Der beste *in vitro* Indikator für eine potentielle *in vivo* Integrität ist eine Kombination aus biochemischer und mechanischer Evaluation sowie das Potential zur Rebesiedlung und die Regenerationsfähigkeit. (Courtman D. W., 1994) (Hülsmann J., 2012) In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an potentiell immunogenen Substanzen im dezellulierten Perikard durch alle Protokolle signifikant abnimmt. Eine ausreichende DNA und

$\alpha$ -Gal-Reduktion konnte jedoch nur mit Protokoll V an porcinem Perikard erreicht werden. Alle fünf verwendeten Protokolle führten zu keiner relevanten Veränderung der mechanischen Eigenschaften. Jedoch konnte festgestellt werden, dass das bovine Perikard deutlich stabiler ist als das porcine. Weitere hämodynamische und *in vivo* Untersuchungen sind notwendig, um eine Aussage über die Überlegenheit einer Perikardart treffen zu können. Dass dezellularisiertes Perikard *in vitro* erfolgreich rebesiedelt werden kann, konnte bereits in vorangehenden Studien gezeigt werden. (Tedder M. E., 2011) (Santoro R., 2015) *In vivo* Studien konnten darüber hinaus Regenerations- und Modellierungsprozesse im Perikard nachweisen. (Dohmen P. M., 2014) Ein Protein, welches eine wichtige Rolle bei der Rebesiedlung und Remodellierung spielt, ist das Osteopontin. Es handelt sich dabei um ein extrazelluläres Protein, welches bei inflammatorischen Prozessen vermehrt exprimiert wird und die Migration von Immun- und Endothelzellen in die ECM steuert. (Giachelli C. M., 1998) (Weintraub A. S., 1996) Zudem wird dem Osteopontin ein anti-kalzifizierender Effekt zugeschrieben. (Giachelli C. M., 2005) Im in der vorliegenden Arbeit untersuchten Perikard konnte nach Dezellularisierung kein Osteopontin mehr nachgewiesen werden. Bei einer potentiellen Rebesiedlung der dezellularisierten Proben *in vivo* könnte Osteopontin somit als biochemischer Marker für eine Infiltration mit Empfängerzellen, auch Immunzellen, gewählt werden. Um ein konstruktives Geweberemodelling zu ermöglichen, muss das effektiv dezellularisierte Gewebe zusätzlich frei von Endotoxinen und bakterieller Kontamination sein. (Daly K. A., 2012) Die Überprüfung kann mithilfe von Zytotoxizitätstests erfolgen. (Cebotari S., 2010) (Tschierschke R., 2010) Eine weitere Bedingung ist es, die Matrix in Kontakt zu einem gesunden Gewebe zu platzieren und sie physiologischen Strömungsbedingungen auszusetzen. Wenn all diese Bedingungen erfüllt sind kommt es zu einer Immunantwort, welche von einem proinflammatorischen in einen umbaufördernden Typ (pro-Remodelling) übergeht. Während des Degradierungsprozesses kommt es zur Rekrutierung von Stamm- oder Vorläuferzellen. Es kommt zu Bildung einer Neomatrix und eines funktionalen Gewebes. Werden die oben genannten Bedingungen jedoch nicht erfüllt, kommt es zu einem chronischen Inflammationsprozess bis hin zur Abstoßungsreaktion. (Londono R., 2014)

#### 4.4 | Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, fünf in der Literatur beschriebene Dezellularisierungsverfahren an bovinem und porcinem Perikard anzuwenden und deren Effekt auf diese zu untersuchen. Der Hintergrund war, dass dezellularisiertes Perikard als Grundgerüst für

tissue engierte Herzklappen dienen soll. In dieser Arbeit konnte lediglich Protokoll V befriedigende Ergebnisse in der Reduktion von potentiell immunogenem Material bei gleichzeitig weitgehendem Erhalt der strukturellen und mechanischen Eigenschaften erreichen.

Anknüpfende Arbeiten könnten sich weiteren Kriterien widmen, die erfüllt sein sollten, damit das dezellularisierte Perikard als optimales Grundgerüst für tissue engierte Herzklappen dienen kann. Beispiele für solche Kriterien sind die Freiheit von Endotoxinen, um eine *in vitro* Besiedlung oder eine *in vivo* Repopulation mit Zellen nicht zu verhindern, und ebenso eine physiologische Funktion hinsichtlich Blutströmungsbedingungen *in vivo*.

---

## 5 | Literaturverzeichnis

**Akhyari P., Kamiya H., Gwanmesia P., Aubin H., Tschierschke R., Hoffmann S., Karck M., Lichtenberg A. 2010.** In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*. 2010, 38, S. 539-546.

**Akhyari P., Minol P., Assmann A., Barth M., Kamiya H., Lichtenberg A. 2011.** Tissue Engineering von Herzklappen. *Der Chirurg*. 2011, 82, S. 311-318.

**Antunes. 2014.** Porcine or bovine: does it really matter? *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2014, S. 1-2.

**Badylak S. F., Gilbert T. W. 2008.** Immune response to biologic scaffold materials. *Seminars in Immunology*. 2008, 20, S. 109-116.

**Borschel G.H., Dennis R. G., Kuzon W.M. 2004.** Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. 2004, 113(2), S. 595-604.

**Cebotari S., Lichtenberg A., Tudorache I., Hilfiker A., Mertsching H., Leyh R., Breyman T., Kallenbach K., Maniuc L., Batrinac A., Repin O., Maliga O., Ciubotaru A., Haverich A. 2006.** Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation*. 2006, 114.

**Cebotari S., Tudorache I., Jaekel T., Hilfiker A., Dorfman S., Ternes W., Haverich A., Lichtenberg A. 2010.** Detergent Decellularization of Heart Valves for Tissue Engineering: Toxicological Effects of Residual Detergents on Human Endothelial Cells. *Artificial Organs*. 2010, 34(3), S. 206-210.

**Collatusso C., Roderjan J. G., Vieira E. D., Myague N. I., de Noronha L., da Costa F. D. A. 2011.** Decellularization as an anticalcification method in stentless bovine pericardium valve prosthesis: a study in sheep. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2011, 26(3), S. 419-426.

**Courtman D. W., Pareira C. A., Kashef V., McComb D., Lee J. M., Wilson G. J. 1994.** Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: Biochemical and mechanical effects of cell extraction. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1994, 28, S. 655-666.

**Crapo P. M., Gilbert T. W., Badylak S. F. 2011.** An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterial*. 2011, 32(12), S. 3233-3243.

---

**Daly K. A., Liu S., Agrawal V., Brown B., Huber A., Johnsson S. A., Reing J., Sicari B., Wolf M., Zhang X., Badylak S. F. 2012.** The Host Response to Endotoxin-Contaminated Dermal Matrix. *Tissue Engineering*. 2012, 18 (11-12), S. 1293-1303.

*DGTHG. Iglauer-Sander, Regina. 2016.* Leipzig : s.n., 2016.

**DHB. 2016.** *Deutscher Herzbericht*. 2016. S. 87-103. 978-3-9817032-5-2 .

**Dohmen P. M., da Costa F., Lopes S. V., Vilani R., Bloch O., Konertz W. 2014.** Successful implantation of a decellularized equine pericardial patch into the systemic circulation. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2014, 20, S. 1-8.

**Dohmen P. M., Lembcke A., Holinski S., Pruss A., Konertz W. 2011.** Ten Years of Clinical Results With a Tissue-Engineered Pulmonary Valve. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2011, 92, S. 1308-14.

**Galili U., Basbaum C. B., Shohet S. B., Buehler J., Macher B. A. 1987.** Identification of Erythrocyte Gal-a-1-3Gal Glycosphingolipids with a Mouse Monoclonal Antibody, Gal-13. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987, 262(10), S. 4683-4688.

**Gauvin R., Marinov G., Mehri Y., Klein J., Li B., Larouche D., Gurman R., Zhang Z., Germain L., Guidoin R. 2012.** A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants. *Journal of Biomaterial Applications*. 2012, 28(4), S. 552-565.

**Geißler H. J., Schlensak C., Südkamp M., Beyersdorf F. 2009.** Herzklappenchirurgie. *Deutsches Ärzteblatt*. 2009, 13, S. 224-233.

**Giachelli C. M., Lombardi D., Johnson R. J., Murry C. E., Almeida M. 1998.** Evidence for a Role of Osteopontin in Macrophage Infiltration in Response to Pathological Stimuli in Vivo. *American Journal of Pathology*. 1998, 152, S. 353-358.

**Giachelli C. M., Speer M. Y., Li X., Rajachar R. M., Yang H. 2005.** Regulation of Vascular Calcification: Roles of Phosphate and Osteopntin. *Circulation Research*. 2005, 96, S. 717-722.

**Gilbert T. W., Freund J. M., Badylak S. F. 2009.** Quantification of DNA in Biologic Scaffold Materials. *Journal of Surgical Research*. 2009, 152, S. 135-139.

**Gilbert T. W., Sellaro T. L., Badylak S. F. 2006.** Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006, 27, S. 3675-3683.

**Goecke T., Tudorache I., Hilfiker A., Haverich A., Cebotari S. 2015.** Präfabrikation von Herzklappen. *Der Chirurg*. 2015.

---

**Goncalves A. C., Griffiths L. G., Anthony R. V., Orton E. C. 2005.** Decellularization of Bovine Pericardium for Tissue-Engineering by Targeted Removal of Xenoantigens. *Journal of Heart Valve Disease*. 2005, 14, S. 212-217.

**Griffiths L. G., Choe L. H., Reardon K. F., Dow S. W., Orton E. C. 2008.** Immunoproteomic identification of bovine pericardium xenoantigens. *Biomaterials*. 2008, 29, S. 3514-3520.

**Hering E., Martin R., Stohrer M. 1995.** *Physik für Ingenieure*. 1995. S. 87 u. 386.

**Herold, G. 2011.** *Innere Medizin*. 2011. S. 153-169.

**Hufnagel C, Villegas PD, Nahas H. 1958.** Experiences with New Types of Aortic Valvular Prostheses. *Annals of Surgery*. 1958, S. 636-644.

**Hülsmann J., Grün K., El Amouri S. Barth M., Hornung K., Holzfuß C., Lichtenberg A., Akhyari P. 2012.** Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing. *Xenotransplantation*. 2012, 19, S. 286-297.

**Ionescu M.I., Tandon A. P., Chidambaram M., Yakirevich V. S., Silverton N. P. 1984.** Durability of the pericardial valve. *European Heart Journal*. 1984, S. 101-106.

**Joseph J., Joseph L., Shekhawat N., Devi S., Wang J., Melchert R., Hauer-Jensen M., Kennedy R. 2003.** Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *American Journal of Physiology*. 2003, 285, S. 679-686.

**Junqueira L., Bignolas G., Brentani R. 1979.** Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. 1979, 11(4), S. 447-455.

**Kasimir M.-T., Rieder E., Seebacher G., Wolner E., Weigel G., Simon P. 2005.** Presence and Elimination of the Xenoantigen Gal(a1,3)Gal in Tissue-Engineered Heart Valves. *Tissue Engineering*. 2005, 11(7/8), S. 1274-1280.

**Keane T. J., Swinehart I. T., Badylak S. F. 2015.** Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*. 2015.

**Kheradvar A., Groves E. M., Georgen C. J., Alavi S. H., Tranquillo R., Simmons C. A., Dasi L. P., Grande-Allen K. J., Mofrad M. R. K., Falahatpisheh A., Griffith B., Baaijens F., Little S. H., Canic S. 2014.** Emerging Trends in Heart Valve Engineering Part II. Novel and Standard Technologies for Aortic Valve Replacement. *Annals of Biomedical Engineering*. 2014.

**Kheradvar A., Groves E. M., Dasi L. P., Alavi H., Tranquillo R., Grande-Allen K. J., Simmons C. A., Griffith B., Falahatpisheh A., Georgen C. J., Mofrad M. R. K.,**

---

**Baaijens F., Little S. H., Canic S. 2014.** Emerging Trends in Heart Valve Engineering: Part I. Solutions for Future. *Annals of Biomedical Engineering*. 2014.

**Langer R., Vacanti J. P. 1993.** Tissue Engineering. *Science*. 1993, 260, S. 920-926.

**Lichtenberg A., Cebotari I., Tudorache G., Sturz W., Winterhalter W., Hilfiker A. 2006.** Flow-dependent re-endothelialization of tissue engineered heart valves. *Heart Valve*. 2006, 15, S. 287-294.

**Londono R., Badylak S. F. 2014.** Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling. *Annals of Biomedical Engineering*. 2014.

**Mendelson K., Schoen F. J. 2006.** Heart Valve Tissue Engineering: Concepts, Approaches, Progress, and Challenges. *Annals of Biomedical Engineering*. 2006, 34(12), S. 1799-1819.

**Mendoza-Novelo B., Avila E. E., Cauich-Rodriguez J. V., Jorge-Herrero E., Rojo F. J., Guinea G. V., Mata-Mata J. L. 2011.** Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta Biomaterialia*. 2011, 7, S. 1241-1248.

**Neuenschwander S., Hoerstrup S. P. 2004.** Heart valve tissue engineering. *Transplant Immunology*. 2004, 12, S. 359-365.

**Neumann A., Cebotari S., Tudorache I., Haverich A., Sarikouch S. 2013.** Heart valve engineering: decellularized allograft matrices in clinical practice. *Biomedical Technology*. 2013, 58(5), S. 453-456.

**Pagoulatou E., Triantaphyllidou I.-E., Vynios D. H., Papachristou D. J., Koletsis E., Deligianni D., Mavrilas D. 2012.** Biomechanical and structural changes following the decellularization of bovine pericardial tissues for use as a tissue engineering scaffold. *Journal of Materials in Science: Materials in Medicine*. 2012, 23, S. 1387-1396.

**Rabkin E., Schoen F. J. 2002.** Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovascular Pathology*. 2002, 11, S. 305-317.

**Rieder E., Seebacher G., Kasimir M., Eichmair E., Winter B., Dekan B., Wolner E., Simon P., Weigel G. 2005.** Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual to attract monocytic cells. *Circulation*. 2005, 111, S. 2792-2797.

**Santoro R., Consolo F., Spiccia M., Piola M., Kassem S., Prandi F., Vinci M. C., Forti E., Polvani G., Fiore G. B., Soncini M., Pesce M. 2015.** Feasibility of pig and human-derived aortic valve interstitial cells seeding on fixative-free decellularized animal pericardium. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2015.

---

**Schünke M., Schulte E., Schumacher U., Voll M., Wesker K. 2005.** *Prometheus LernAtlas der Anatomie Hals und Innere Organe*. 2005. S. 67.

**Shinoka T., Breuer C., Tanel R., Zund G., Miura T., Ma P., Langer R., Vacanti J., Mayer J. 1995.** Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Annals of Thoracic Surgery*. 1995, S. 513--6.

**Simionescu D., Iozzo R., Kefalides N. 1989.** Bovine Pericardial Proteoglycan: Biochemical, Immunochemical and Ultrastructural Studies. *Matrix*. 1989, 9, S. 301-310.

**Steinhoff G., Stock U., Bader A., Haverich A. 2000.** Gewebezüchtung (Tissue Engineering) von Herzklappen. *Deutsches Ärzteblatt*. 97, 2000, 8, S. 448-451.

**Steinhoff G., Stock U., Karim N., Mertsching H., Timke A., Meliss R. R., Pethig K., Haverich A., Bader A. 2000.** Tissue Engineering of Pulmonary Heart Valves on Allogenic Acellular Matrix Conduits. *Circulation*. 2000, 102, S. III-50-III-55.

**Sweat F., Puchtler H., Rosenthal S. 1964.** Sirius Red F3BA as a stain for connective tissue. *Archives of Pathology*. 1964, 78, S. 69-72.

**Tedder M. E., Liao J., Weed B., Stabler C., Zhang H., Simionescu A., Simionescu D.T. 2009.** Stabilized Collagen Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering. *Tissue Engineering*. 2009, 15(6), S. 1257-1268.

**Tedder M. E., Simionescu A., Chen J., Liao J., Simionescu D. T. 2011.** Assembly and Testing of Stem Cell-Seeded Layered Collagen Constructs for Heart Valve Tissue Engineering. *Tissue Engineering*. 2011, 17(1/2), S. 25-36.

**Teebken O. E., Kofidis T., Akhyari P., Haverich A. 2007.** Tissue-Engineering ist mehr als nur Gewebezüchtung. *Zentralblatt für Chirurgie*. 2007, 132, S. 236-246.

**Timasheff S. 1993.** The Control of Protein Stability an Association by weak Interactions with Water: How do Solvents affect these Processes. *Annual Review of Biophysics and Molecular Structure*. 1993, 22, S. 67-97.

**Tschierschke R., Akhyari A., Lichtenberg A. 2010.** *Evaluation verschiedener Dezellularisierungsprotokolle an ovinen Aortenklappen*. Medizinische Fakultät Heidelberg. 2010.

**Vinci M. C., Tessitore G., Castiglioni L., Prandi F., Soncini M., Santoro R., Consolo F., Colazzo F., Micheli B., Sironi L., Polvani G., Pesce M. 2013.** Mechanical Compliance and Immunological Compatibility of Fixative-Free Decellularized/Cryopreserved Human Pericardium. *PLoS ONE*. 2013, 8(5).

**Weintraub A. S., Giachelli C. M., Krauss R. S., Almeida M., Taubman M. B. 1996.** Autocrine secretion of osteopontin by vascular smooth muscle cells regulates their adhesion to collagen gels. *The American Journal of Pathology*. 1996, 149 (1), S. 259-272.

**Yang M., Chen C.-Z., Wang X.-N., Zhu Y.-B., Gu Y. J. 2009.** Favorable Effects of the Detergent and Enzyme Extraction Method for Preparing Decellularized Bovine Pericardium Scaffold for Tissue Engineered Hear Valves. *Wiley InterScience*. 2009.

## **Danksagung**

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. med. Payam Akhyari danke ich besonders für seine hervorragende Betreuung und für die konstruktiven Diskussionen.

Ein weiterer Dank gilt der gesamten Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann, meinen Geschwistern und meinen Eltern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.