

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

**Optimierungskonzepte
zur funktionellen Vaskularisierung,
Oberflächen-Biofunktionalisierung und Herstellung
von kardialen Extrazellulären Matrix-Gerüsten**

Dissertation

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

vorgelegt von

Nicolas Schütterle

2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Hug Aubin

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

Meinen geliebten Großeltern
Waltraud und Heribert Hörner

Publikationen (Stand Februar 2020)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. H. Aubin, C. Mas-Moruno, M. Iijima, N. Schütterle, M. Steinbrink, A. Assmann, J. Gil, A. Lichtenberg, M. Pegueroles, and P. Akhyari, „*Customized interface biofunctionalization of decellularized extracellular matrix: towards enhanced endothelialization*”, *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 22, no. 5. 2016.
2. J. Hülsmann, H. Aubin, F. Oberle, N. Schütterle, S. T. Bandesha, M. Iijima, A. Lichtenberg, and P. Akhyari, „Mechanistics of biomass discharge during whole-heart decellularization”, *Biomed. Mater.*, vol. 13, no. 3. 2018.

Zusammenfassung

Weltweit herrscht ein Mangel an verfügbaren Spenderorganen zur Behandlung von terminalem Organversagen. Insbesondere im Bereich der Herzchirurgie wird dies deutlich. Das sog. *Whole Organ-Tissue Engineering* bietet vielversprechende Lösungsansätze, z.B. durch Herstellung von dezellularisierten kardialen und drei-dimensionalen Trägermatrizen zum bioartifiziellen myokardialen Gewebeersatz. Diese zeigen optimale physiologische, chemische und strukturelle Eigenschaften im Rahmen eines natürlichen extrazellulären Mikroklimas.

Trotz zahlreicher Erfolge verbleiben entscheidende Limitationen auf dem Weg zum klinischen Einsatz eines bioartifiziellen Herzersatzes. Problematisch zeigt sich die überlebenswichtige und nicht allein durch Diffusion erreichbare Sauerstoff- und Nährstoffversorgung von Gewebekonstrukten ab einer Größe von ca. 100 μm . Deshalb wurde im Rahmen dieser Dissertationsarbeit anhand der Re-Vaskularisierung des vorhandenen nativen Gefäßsystems eines dezellularisierten Rattenherzens mittels menschlichen Nabelschnurvenenzellen eine selektive und funktionelle Endothelschicht als potentieller Lösungsansatz gebildet. Durch (immun-)histologische und molekulargenetische Untersuchungen konnte die Gefäßselektivität und Funktionalität der Besiedlung bildmorphologisch und anhand eines *TNF- α* -Stimulationsversuchs nachgewiesen werden.

Weiteres Optimierungspotenzial liegt in der Verbesserung von erwünschten Zell-Matrix-Interaktionen, wie z.B. einer verbesserten Adhäsionsfähigkeit und Verankerung von Zellen innerhalb der Extrazellulären Matrix. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit die Oberfläche von dezellularisierten Schafsherzklappensegeln mit eigens hergestellten bioaktiven Peptiden funktionalisiert und der Einfluss der gezielten Oberflächen-Funktionalisierung auf die Adhärenz von humanen Endothelzellen (engl. *Human umbilical vein cells – HUVECs*) *in vitro* untersucht. Durch die Kombination zweier hauptsächlich von Integrin abgeleiteter bioaktiver Peptidsequenzen konnte nach einer Besiedlungszeit von 4 h eine signifikante Verbesserung der HUVEC-Zelladhäsion gegenüber der Kontrollgruppe erreicht werden.

Um einen klinischen Einsatz zu ermöglichen, ist es notwendig, Konstrukte aus dezellularisierter Extrazellulärer Matrix (EZM) in humanen Dimensionen herzustellen. Mit den bereits zuvor in der Arbeitsgruppe gewonnenen Erfahrungen der Kleintierherz-Dezellularisierung konnte zudem durch Modifizierung eines etablierten Protokolls die perfusionsbasierte *in toto* Dezellularisierung von ovinen Herzen mit dieser Arbeit erfolgreich demonstriert werden.

Nun gilt es, die zahlreichen Lösungsansätze weiter zu vertiefen und mit weiteren Forschungsfeldern, wie z.B. der Stammzellen- und Bioreaktorforschung zu kombinieren, um die derzeitigen limitierenden Faktoren zu überwinden. Denn trotz intensiver Forschung und erzielten Fortschritten bleibt der Traum des funktionstüchtigen artifiziellen Herzersatzes als Alternative beim vorherrschenden Organspende-Mangel noch in weiter Ferne.

Summary

A shortage of donor organs for the treatment of terminal organ disease is affecting thousands of patients worldwide, especially in the field of cardiac surgery. While allogenic organ transplants remain the gold standard, whole-organ tissue engineering holds great potential for future treatment options, as decellularized organ scaffolds may provide optimal physiological, chemical and microarchitectural environment for myocardial tissue replacement. However, despite great progress in the tissue engineering field, existing techniques still need to be optimized in order to pave the way towards a clinical application of a bioartificial heart.

One major challenge is the supply of oxygen and other key cell nutrition in bioartificial tissue constructs larger than 100µm, which represents a critical diffusion barrier. Hence, in this study we recellularized the vascular system of rodent decellularized extracellular matrix scaffolds (dECM) with human umbilical vein cells (HUVECs) in order to analyze the potential to recreate a functional endothelial cell layer. Seeding selectivity to the vascular system as well as cell viability and morphology were evaluated by histological and immunohistological staining. In addition, endothelial function and adequate reaction to external stimulation of re-populated cells were evaluated by rtPCR of endothelial and inflammatory gene response following *in vitro* stimulation with Tumor necrosis factor alpha (TNF- α).

To further optimize seeding selectivity and cell-matrix adhesion custom-made synthetic peptides were used to functionalize the dECM scaffolds with different cell adhesive sequences. Therefore, decellularized and functionalized ovine pulmonary valve leaflets were seeded with HUVECs and cell adhesion after 1 and 4 h was analyzed. Here, the combination of two *Integrin*-Protein-derived sequences, which function as a transmembrane cell receptor for mediating ECM-cell-binding, significantly improved cell adhesion on ovine dECM after four hours of colonization.

In order to implement the clinical use of whole organ tissue engineering, functional organ constructs in dimensions of human organs will need to be generated. Therefore, we further modified an already established decellularization protocol for rodent hearts in order to achieve the *in toto* decellularization of “human scale” ovine hearts. In a proof of concept study, we could demonstrate complete cell free dECM of *in toto* decellularized whole hearts, comparable to what has been shown previously on a smaller scale with rodent hearts.

However, all the above optimization strategies need to be combined with recent and future achievements in stem cell and bioreactor technology in order to overcome the limitations, which lie in the engineering of bioartificial organs. Despite the progress made in the field of whole organ tissue engineering it is still a very long way to go in order to reach the goal of a bioartificial heart replacement in humans.

Abkürzungsverzeichnis

Abb. xy	Abbildung xy
AoC	<i>Area occupied by Cells</i>
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DCA	Desoxycholsäure
dECM	<i>Decellularized Extracellular Matrix</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
GAG	Glykosaminoglykane
H.E.-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HI	Herzinsuffizienz
HTX	Herztransplantation
HUVECs	<i>Human Umbilical Vein Cells</i>
KHK	Koronare Herzerkrankung
KM	Kardiomyopathien
LANUV NRW	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
LVAD	<i>Left Ventricular Assist Device</i>
MW	Mittelwert
NaCl	Natrium Chlorid, Kochsalz
NaN₃	Natriumazid
NYHA	New York Heart Association
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
Pen-Strep	Penicillin und Streptomycin
RIN-Wert	<i>RNA Integrity Number</i> -Wert
Rkf	Rückführung
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RoI	<i>Region of Interest</i>
rt-PCR	<i>Real Time- Polymerase Chain Reaction</i>
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. <i>standard error of the mean</i>)
TAoC	<i>Total area occupied by cells</i>
THBD	Thrombomodulin
TNF-α	Tumor Nekrose Factor-alpha
vWF	Von-Willebrandt Faktor

Inhaltsverzeichnis

Publikationen (Stand Februar 2020).....	IV
Zusammenfassung	V
Summary	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Grenzen der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz.....	1
1.2 <i>Tissue Engineering</i>	3
1.3 Dezellularisierung von nativen Geweben und Organen	5
1.4 <i>Tissue Engineering</i> in der kardiovaskulären Medizin	6
1.5 Grenzen und Potenzial des <i>Tissue Engineering</i>	8
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	11
2 Materialien	12
2.1 Organentnahme und Präparation	12
2.2 Dezellularisierung und Detergenzien.....	12
2.3 Histologie und Immunhistologie	12
2.4 Antigene	14
2.5 Molekularbiologie.....	14
2.6 Re-Endothelialisierung und <i>Tissue-Flap</i> -Präparation (Zellkultur).....	14
2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien	15
2.8 Technische Anlagen.....	17
2.8.1 Automatisierte, softwaregesteuerte perfusionsbasierte Dezellularisierungsanlage	17
2.8.2 Perfusionskammer und Schlauchsystem.....	18
2.8.3 Disc-System zur <i>in vitro</i> Besiedlung und Biofunktionalisierung.....	20
3 Methoden.....	22
3.1 Spendertiere, Herzentnahme und Präparation	22
3.1.1 Spendertiere und Präparation der Rattenherzen	22
3.1.2 Spendertiere und Präparation der Lammherzen	23
3.1.3 Präparation der ovinen Pulmonalklappen	23
3.2 Detergensbasierte Gewebedezellularisierung.....	24

3.2.1	Lösungen zur Dezellularisierung von kardialen Gewebe	24
3.2.2	Perfusionsbasierte <i>in toto</i> Herzdezellularisierung	26
3.2.3	Diffusionsbasierte Gewebedezellularisierung	27
3.2.4	Protokolle für die <i>in toto</i> Dezellularisierung von Herzen	28
3.3	Zellkultur	30
3.4	Funktionelle Vaskularisierung dezellularisierter kardialer EZM	31
3.4.1	Zellbesiedlung der Rattenherzen	32
3.4.2	Präparation des <i>Tissue Flap</i>	34
3.4.3	Mikroskopische Kontrolle der Besiedlung	35
3.4.4	<i>TNF-α</i> -Stimulation der <i>HUVECs</i>	35
3.4.4.1	Stimulation der <i>HUVECs</i> in Zellkultur	36
3.4.4.2	Stimulation der <i>HUVECs</i> im <i>Tissue Flap</i> -Modell	36
3.4.5	Molekulargenetische Auswertung	37
3.4.5.1	RNA-Isolation	37
3.4.5.2	Quantität und Qualität der RNA	37
3.4.5.3	Umschreibung cDNA	37
3.4.5.4	Real-Time qPCR	38
3.4.5.5	Antiinflammatorische Gene	38
3.4.5.6	Antithrombogene Gene	39
3.5	Oberflächenfunktionalisierung oviner kardialer <i>dECM</i>	40
3.5.1	Oberflächenfunktionalisierung mittels bioaktiver Peptide	40
3.5.2	Peptidaufbau und Funktion	41
3.5.3	Präparation der Klappensegel	43
3.5.4	Peptidbeschichtung der Klappensegel durch das <i>Disc</i> -System	44
3.5.5	Versuchsgruppen	45
3.5.6	Besiedlung mit <i>HUVECs</i>	45
3.5.7	Aufnahmetechnik	47
3.5.8	Auswertung	47
3.6	Probenentnahme und Verarbeitung <i>human-size</i> EZM-Konstrukte	50
3.7	Histologie und Immunhistologie	51
3.7.1	Histologische Färbungen	52
3.7.2	Immunhistologische Färbungen	53
3.7.3	Antigene	54
3.7.4	Mikroskopie und Fotodokumentation	55

4	Ergebnisse	56
4.1	Funktionelle Re-Endothelialisierung kardialer <i>dECM</i>	56
4.1.1	<i>In toto</i> Herzdezellularisierung von Rattenherzen.....	56
4.1.2	Selektive Re-Endothelialisierung des Rattenherzgefäßsystems.....	57
4.1.2.1	DAPI-Färbung	57
4.1.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)	58
4.1.2.3	Movat-Pentachromfärbung.....	59
4.1.2.4	Calcein-Färbung	60
4.1.2.5	Von-Willebrand-Faktor Immunfärbung.....	61
4.1.2.6	CD31-Färbung	62
4.1.2.7	Phalloidin-Färbung	63
4.1.3	<i>TNF-α</i> -Stimulationstest	64
4.1.3.1	Evaluation der relativen Genexpression nach <i>TNF-α</i> -Stimulation	66
4.1.3.1.1	Thrombomodulin (THBD)	66
4.1.3.1.2	<i>Tissue Factor</i>	67
4.1.3.1.3	ICAM-1	67
4.1.3.1.4	E-Selectin	68
4.1.3.1.5	VCAM-1	69
4.2	Oberflächenfunktionalisierung von dezellularisierter kardialer EZM.....	70
4.2.1	Vorversuche zur Auswahl der optimalen Zellkonzentration	70
4.2.2	Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung mittels fluoreszenzmarkierter Peptide	70
4.2.3	<i>In vitro</i> -Zell-Adhäsion	71
4.2.3.1	Einzel- und Doppelfunktionalisierung.....	71
4.3	Herstellung von <i>human-size dECM</i> -Gerüsten	74
4.3.1	Modifizierung eines etablierten Protokolls zur Kleintierherz- Dezellularisierung für die <i>in toto</i> Dezellularisierung von ovinen Herzen...	74
4.3.2	Etablierungsphase und Protokoll-Validierung mittels makroskopischer und mikroskopischer Evaluation der Dezellularisierungsqualität.....	75
4.3.3	<i>Human-size dECM</i> -Konstrukte auf Basis von <i>in toto</i> dezellularisierten ovinen Herzen	81
5	Diskussion.....	83
5.1	Rekapitulation der Zielsetzung.....	83
5.2	<i>dECM</i> als Basis des kardiovaskulären <i>Tissue Engineering</i>	84

5.3	Klinische Anwendung und Meilensteine der Forschung	84
5.4	Limitationen des kardiovaskulären <i>Tissue Engineering</i>	85
5.5	Funktionelle Vaskularisierung dezellularisierter kardialer EZM	87
5.6	Biofunktionalisierung dezellularisierter kardialer EZM	87
5.7	Herstellung von <i>human-size dECM</i> -Gerüsten	89
5.8	Mögliche Zukunft des kardiovaskulären <i>Tissue Engineering</i>	90
5.9	Eignung und Limitationen der angewandten Methoden	92
5.9.1	Auswahl der Spendertiere und Übertragbarkeit der Ergebnisse	92
5.9.2	Methodik der Dezellularisierung	93
5.9.3	Funktionelle Vaskularisierung dezellularisierter kardialer EZM	94
5.9.4	Oberflächenbiofunktionalisierung von dezellularisierter kardialer EZM....	95
5.9.5	Generierung von kardialen <i>human-size dECM</i> -Gerüsten	96
5.10	Zusammenfassung	97
Literaturverzeichnis		99
Anhang		109
Abbildungsverzeichnis		109
Tabellenverzeichnis		111

1 Einleitung

1.1 Grenzen der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz

Für die meisten Patienten mit chronisch progredienten Erkrankungen, bei denen ein terminales Organversagen droht, bleibt zurzeit die allogene Transplantation die einzige Option der kurativen Therapie. Beispiele hierfür sind die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Leberzirrhose, Nierenversagen [1], die koronare Herzerkrankung (KHK) und Kardiomyopathien (KM). [2] Alternative Verfahren haben bis dato keine vergleichbaren Ergebnisse erzielen können. Aufgrund des vorherrschenden Ungleichgewichtes zwischen Spenderorganen und transplantationspflichtigen Empfängern ist es jedoch notwendig, weitere alternative Therapien zu erforschen.

Innerhalb der kardiovaskulären Medizin führen die meisten relevanten kardiovaskulären Erkrankungen im Verlauf zu einer akuten oder chronischen Herzinsuffizienz (HI). So zählt die Herzinsuffizienz, unabhängig von ihrer auslösenden Pathologie, zur gemeinsamen Endstrecke von arterieller Hypertonie, KHK, Kardiomyopathie und Arrhythmie. Die typischen klinischen Symptome der HI sind Müdigkeit, reduzierte physische Belastbarkeit, Dyspnoe und Flüssigkeitsretention. Die Stadieneinteilung der HI erfolgt anhand der *New York Heart Association* (NYHA-Stadien) in vier Stadien. Diese Klassifizierung berücksichtigt die mögliche körperliche Belastung bis zum Auftreten von Symptomen der HI. NYHA I entspricht dabei einer HI ohne körperliche Limitationen, wobei NYHA IV bereits eine auftretende Dyspnoe bei Bettruhe beschreibt.

Neben der rein symptomatischen medikamentösen Therapie der HI, ist die Herztransplantation (HTX) als kausale Therapie zurzeit der Goldstandard für die Behandlung der terminalen HI. Indikationen für die HTX sind unter anderem ein NYHA-Stadium IV, eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion $< 20\%$, ein Herzindex $< 2 \text{ L/min/m}^2$ und eine maximale Sauerstoffaufnahme von $< 10\text{-}14 \text{ ml/kg/min}$. [2][4][5] Beispiele für absolute Kontraindikationen sind additive irreversible Endorganschäden z.B. Nieren- oder Leberinsuffizienz, nicht kurativ behandelte Tumorerkrankungen, bestehende schwere Suchterkrankungen wie Nikotin-, Alkohol- oder sonstiger Drogenabusus und mangelnde psychosoziale *Compliance*. [5] Zusätzlich zur strengen Indikationsstellung erschwert die begrenzte Verfügbarkeit von Spenderherzen die kausale Therapie der Herzinsuffizienz. Transplantierte Patienten allerdings können derzeit mit einer 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von rund 80% und einem 5-Jahres-Überleben von über 70% rechnen. [6][7]

Zu den postoperativen Komplikationen erfolgreicher Transplantationen zählen postoperative Infektionen, Tumorleiden, arterielle Hypertonien, Fettstoffwechselstörungen und renale Dysfunktionen. Auch die stetig drohende Gefahr der akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion sowie die Notwendigkeit und das Risiko einer lebenslangen immunsuppressiven Therapie limitieren die Lebensqualität der Patienten. [7]

Aktuell wird in der kardiovaskulären Medizin versucht, dem vorhandenen Engpass an verfügbaren Spenderherzen durch die Nutzung alternativer mechanischer Methoden zu begegnen. Hierzu zählen verschiedene Unterstützungssysteme, die in das Herz eingebracht werden und dessen Funktion teilweise oder vollständig übernehmen können. Vereinfacht dargestellt handelt es sich bei den aktuellen Systemen um Pumpensysteme, die das Blut über einen elektrisch angetriebenen Rotor vom linken Ventrikel in die *Aorta ascendens* pumpen. Patienten mit linksventrikulären Assistenzsystemen (engl. *Left Ventricular Assist Device* (LVAD)) haben eine bessere Lebensqualität und Überlebensrate als medikamentös behandelte Patienten, ohne jedoch die Lebensqualität und das Überleben des Goldstandard HTX zu erreichen. [8][9]

Im Bereich der mechanischen Kreislaufunterstützung werden derzeit unterschiedliche Behandlungskonzepte eingesetzt. Im sogenannten *Bridge to Transplant*-Konzept wird ein LVAD eingesetzt, um eine längere Wartezeit auf ein geeignetes Spenderorgan zu ermöglichen. Eine endgültige Therapie stellt das *Destination-Therapy*-Konzept dar. Das LVAD wird dabei implantiert, ohne dass eine Herztransplantation im weiteren Verlauf – aufgrund von Kontraindikationen, wie zum Beispiel Alter oder Komorbiditäten – möglich ist. Als *Bridge to Recovery* wird ein weiteres Konzept benannt, bei dem es nach Einbau des LVAD zu einer Erholung des entlasteten Myokards kommt und der Patient dadurch in der Lage ist, eine für das Überleben ausreichende Pumpfunktion wiederzuerlangen. Als kurzfristige Lösung, bei einer noch unklaren klinischen Situation und fehlenden Entscheidungsmöglichkeiten, beispielsweise im akuten Herzversagen mit unklarem neurologischen Ausgang, hat sich das *Bridge to Decision*-Konzept etabliert, für das in der Regel temporäre mechanische Unterstützungssysteme eingesetzt werden. [7] Im weiteren Verlauf kann dann über die Möglichkeit der HTX oder der definitiven Versorgung mittels LVAD entschieden werden. Trotz des rasanten technischen Fortschritts konnten in der Vergangenheit einige schwerwiegende Nachteile der mechanischen Unterstützungssysteme zwar verbessert, aber noch nicht endgültig beseitigt werden. Als elektrische Geräte müssen die LVAD-Systeme zurzeit noch über Batterien und eine kabelgebundene Stromversorgung zur Pumpe verfügen. Die Batterien und Steuerungseinheiten müssen dabei ständig am Körper mitgeführt werden. Die sogenannte *Driveline*, das Verbindungsstück zwischen Batterie und Pumpe, birgt als Eintrittspforte für pathogene Keime das Risiko von schweren Infektionen. [10][11] Auch eine

lebenslange Antikoagulation bleibt durch die Fremdoberfläche der mechanischen Systeme weiterhin obligat. Weiterhin zählen der ischämische und hämorrhagische zerebrale Insult noch immer zu den häufigsten und schwerwiegendsten LVAD-Komplikationen. Pro Patientenjahr ereignen sich bei der 3. Generation der Systeme 0,18 Schlaganfälle. [8][12] Damit hat rechnerisch fast jeder Patient, der von einem LVAD unterstützt wird, nach 5 Jahren ein ischämisches zerebrales Ereignis. LVAD-Patienten haben darüber hinaus eine erhöhte Hospitalisierungsrate und schneiden in der Alltagsbelastbarkeit schlechter ab als Patienten nach einer Herztransplantation.

Zusammenfassend sind die mechanischen Unterstützungssysteme der Herztransplantation als Goldstandard der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz noch unterlegen. Trotzdem werden aufgrund der Diskrepanz zwischen Spenderorganen und möglichen Empfängern, bei zuletzt (2018) nur 318 HTX pro Jahr in Deutschland [13] und über 1000 Patienten auf der Warteliste, die mechanischen Unterstützungssysteme dringend benötigt. Im Jahr 2018 wurden insgesamt 942 Kunstherzsysteme in verschiedenen Ausführungen implantiert. Somit wurden fast dreimal so viele Patienten mit einem mechanischen Unterstützungssystem versorgt, als Herzen transplantiert. [14] Der demografische Wandel, mit einer immer älter werdenden Gesellschaft und die sinkende Anzahl von Organ Spendern verstärkt das Problem zusätzlich, sodass ein dringender Bedarf an alternativen Therapieansätzen besteht.

1.2 *Tissue Engineering*

Das Forschungsfeld des *Tissue Engineering* arbeitet interdisziplinär und vereint Methoden der Ingenieurwissenschaften mit denen der biomedizinischen und biochemischen Wissenschaften. 1993 wurde *Tissue Engineering* von Langer und Vacanti folgendermaßen definiert:

„*Tissue Engineering* ist ein interdisziplinäres Feld, welches die Methoden der Ingenieurwissenschaften und der Naturwissenschaften miteinander vereint, um biologische Ersatzstoffe zu entwickeln, um die Funktion von Geweben wiederherzustellen, zu erhalten und zu verbessern.“ [15]

Das Kernelement des *Tissue Engineering* ist dabei die Herstellung von funktionellen, bioartifiziellen Geweben. Individuell angepasst sollen diese dreidimensionalen Konstrukte die physiologischen Aufgaben der geschädigten Organstrukturen in erkrankten Organismen übernehmen. Hierzu zählen Regeneration-, Proliferation und Übernahme der spezifischen Stoffwechselaktivität. [15] Die Herstellung dieser funktionellen Gewebe erfolgt meist durch die Besiedlung eines biologisch modifizierten oder synthetischen dreidimensionalen Konstrukts. Als Zellgerüst agierend kann dieses Konstrukt dabei mit verschiedensten Zellarten – je nach zu erfüllender Funktion

– besiedelt werden. Idealerweise bereiten diese Gerüststrukturen dabei eine biologische oder synthetische Mikroumgebung aus Wachstumsfaktoren und Zytokinen. [16] Diese bieten die für eine physiologische Zellaktivität benötigten, chemischen Stimuli. Für die ebenfalls notwendigen physikalisch-mechanischen Stimuli werden z.B. spezielle Bioreaktorsysteme eingesetzt. [17] Die Kombination der drei Grundbausteine Gerüstkonstrukt, Zellbesiedlung und adäquate chemische und physikalische Stimulation soll dabei in synergistischer Weise funktionelle, bioartifizielle Gewebe erschaffen. Durch die Anwendung der vorgestellten Prinzipien konnten in den vergangenen Jahren bereits neue Behandlungsmethoden und experimentelle Konzepte in verschiedenen Bereichen der Medizin etabliert werden. So sind einfache biofunktionelle Transplantate zur Deckung und zum Ersatz von unterschiedlichen strukturellen Defekten, wie z.B. von Haut und Knochen bereits im klinischen Einsatz zu finden. [18][19] Der Ersatz von komplexeren Geweben durch *Tissue Engineering* findet z.B. im Rahmen *in vivo* hergestellter Pulmonalklappen zur Implantation bei Kindern mit Herzklappenerkrankungen seine Anwendung. Hier zeigt sich zugleich der große Vorteil individuell angepasster, bioartifizieller Konstrukte. Denn durch die biologische Aktivität sind die künstlichen Herzklappen in der Lage mit den erkrankten Kindern im Verlauf mitzuwachsen. [20] Als anspruchsvollste Aufgabe des *Tissue Engineerings* ist als logische Konsequenz die Entwicklung von ganzen Organsystemen zu sehen. Dieser Forschungsbereich wird im Englischen als *Whole-Organ Tissue Engineering* bezeichnet. Erste Erfolge und vielversprechende Konzepte wurden bereits in diesem Feld erreicht. Zahlreiche experimentelle Studien mit bioartifiziellen Organen wurden sowohl *in vitro*, als auch in tierexperimentellen Arbeiten mit verschiedensten Organsystemen bereits erfolgreich durchgeführt. Hierzu zählen unter anderem Leber [21], Lunge [22], Pankreas [23], Herz [24] und Niere. [25] Die prinzipielle humane Anwendbarkeit zeigte z.B. Atala et al. bereits 2006, als von der Arbeitsgruppe durch *Tissue Engineering* hergestellte, bioartifizielle Harnblasen in Patienten mit neurogener Blasenstörung implantiert wurden, die gute funktionelle Ergebnisse zeigte. [26] Der Einsatz von *Tissue Engineering* ist dabei neben experimentellen Anwendungen – abhängig von der Fachrichtung – bereits im klinischen Alltag angekommen. Insbesondere zur Deckung von Weichteildefekten, aber auch im Bereich von Gefäß- und Herzchirurgie werden zahlreiche *tissue-engineerte* Konstrukte angewendet, die zum Teil von kommerziellen Anbietern hergestellt werden.

Zukünftig könnte *Tissue Engineering* auch regelhaft genutzt werden, um durch technische Verfahren, synthetisch hergestellte Materialien mit biologisch verfügbaren zu modifizieren und die Vorteile der artifiziellen und biologischen Materialien zu vereinen. Mögliche Anwendungsbeispiele erstrecken sich hier von der orthopädischen bis zur kardiovaskulären Implantationschirurgie. [27]

1.3 Dezellularisierung von nativen Geweben und Organen

Einer der größten potenziellen Vorteile in der Entwicklung von bioartifiziellen Organen besteht dabei in der Möglichkeit vorhandene Ressourcen – z.B. humane Organspender – universeller nutzbar zu machen oder gänzlich neue Ressourcen, wie z.B. xenogenen Organersatz zu erschließen.

Zu den wichtigsten Methoden, um natürliches Gewebe als Gerüstkonstrukt für individuelle Gewebeersatzverfahren nutzbar zu machen, zählt die Dezellularisierung. Als Dezellularisierung bezeichnet man die Entfernung jeglichen zellulären Materials aus einem nativen Gewebe oder Organ und damit auch die Entfernung von potenziell immunreaktiven Epitopen und Oberflächenmarkern. [28][29] Aktuell stehen unterschiedliche Methoden der Dezellularisierung zur Verfügung, man unterscheidet hauptsächlich physikalische, enzymatische, chemische oder Kombinationsverfahren. [30] Darüber hinaus gibt es verschiedene Wege, um das Gewebe oder das Organ mit dem meist flüssigen Dezellularisierungsmittel zusammenzuführen. Es wird in perfusions- und diffusionsbasierte Verfahren unterschieden, wobei diese ebenfalls in Kombination eingesetzt werden können. [31] Im Wesentlichen kommt es darauf an, ob das ganze Organ oder einzelne Strukturen, wie z.B. eine Herzklappe, dezellularisiert werden sollen. Dabei ist zu beachten, dass eine perfusionsbasierte Dezellularisierung eine gute Vaskularisierung des Gewebes voraussetzt. Wohingegen für die Diffusionsmethode eine ausreichende Umspülung mit Dezellularisierungsmittel essenziell und der Durchmesser der Struktur limitierend für eine suffiziente Dezellularisierung ist.

Im ersten Schritt des Dezellularisierungsprozesses müssen die Zellmembranen lysiert werden, damit alle intrazellulären Bestandteile für die weiteren Reaktionsschritte zugänglich sind. Im nächsten Schritt ist es nötig die Bausteine der Zellmembran und des Cytoplasmas aus der umgebenden Extrazellulären Matrix (EZM) herauszulösen. Je nach Gewebe unterscheiden sich dabei die extrazellulären Bestandteile, wie z.B. Kollagene und Glykosaminoglykane in deren Zusammensetzung und spezifischem Anteil. [32][33][34] Die genannten zellulären Komponenten, inklusive der Zellorganellen, Zellkernmembrane und DNA müssen löslich gemacht werden, damit sie im nächsten Schritt möglichst vollständig aus der Matrix ausgespült werden können. Im Idealfall entsteht so mit der richtigen Auswahl des Dezellularisierungsmittels eine Struktur, welche als reines Trägergerüst und immunologisch neutral als Ausgangsmaterial für weitere Anwendungen fungiert. [35][30][36] Mittels maßgeschneiderter Dezellularisierungsanlagen lässt sich der Prozess der Dezellularisierung automatisieren, wodurch eine Überwachung und Steuerung der zur Dezellularisierung notwendigen physikalischen Parameter erreicht werden kann.

Zum Beispiel ist es bei perfusionsbasierten Verfahren möglich, Druckkurven und Flussgeschwindigkeiten zu erfassen, zu evaluieren und gegebenenfalls anzupassen. [35]

Das Ziel einer erfolgreichen Dezellularisierung besteht in der völligen Zellfreiheit des Spendermaterials. Zusätzlich soll gewährleistet werden, dass die EZM mit seinen zahlreichen Strukturproteinen und dem verbleibenden vaskulären System möglichst erhalten bleibt. Dies ist von Bedeutung, da die EZM eine funktionelle, bioaktive und organspezifische Ultrastruktur bildet, welche für die Funktion des einzelnen Gewebes oder Organs entscheidend ist.

1.4 **Tissue Engineering in der kardiovaskulären Medizin**

So vielfältig sich die Krankheitsbilder der kardiovaskulären Medizin darstellen, so vielfältig sind auch die Anwendungsgebiete und Forschungsfelder des *Tissue Engineering* in diesem Bereich. Die *in vitro* Testung von Pharmaka, durchgeführt an standardisierten, dezellularisierten und re-besiedelten EZM-Modellen, ist beispielsweise ein auf *Tissue Engineering* basierender Ansatz der pharmakologischen-kardiovaskulären Forschung. [37] Die durch Dezellularisierung entstandenen EZM-Konstrukte, aus dem Englischen und fortan *Decellularized Extracellular Matrix*, kurz auch *dECM* genannt, bieten durch die physiologische Mikroumgebung des Ursprungsgewebes optimale Plattformen für die Erforschung verschiedener Zellreihen und deren Verhalten. So können etwa Stammzellen oder Endothelzellen in der Interaktion mit der EZM, als Zwischenschritt der reinen *in vitro* Zellkultur zum *in vivo* Experiment untersucht werden und damit helfen, chronische und akute Krankheiten besser zu verstehen. [38]

Ein weiterer Anwendungsbereich des kardiovaskulären *Tissue Engineering* liegt in der Regeneration beschädigten Gewebes. Zum Beispiel von myokardialen Gewebe, welches durch ein Infarktgeschehen in seiner Funktion beeinträchtigt wurde. Innerhalb von tierexperimentellen, aber auch in humanen klinischen Studien konnte diesem infarzierten Gewebe mithilfe von zellhaltigen Injektionen und der Implantation von *dECM*-Matrizen zu einer besseren Funktion oder Regeneration verholfen werden. [39][40][41] Im Falle der Injektionen können verschiedene pluripotente Stammzellen oder differenzierte myokardiale Zelltypen einzeln oder als Kombination zur lokalen Anwendung im Infarktbereich gebracht werden. Ebenfalls gibt es Ansätze bei denen ganze Gewebe im Sinne von EZM-Gerüsten in die kompromittierten Areale implantiert werden. [42] Diese Gewebe können von biologischen und lediglich dezellularisierten Geweben entstammen (engl.: *Native Tissue Derived dECM*) oder gänzlich synthetisch hergestellt sein und eine EZM-ähnliche Struktur bilden. Synthetische Gewebe orientieren sich dabei meist an Bestandteilen der natürlichen EZM und bestehen beispielsweise aus Kollagenen [43], Zel-

lulose [44], Alginat [45] oder Gelatine [46]. Gänzlich synthetische Ansätze bestehen etwa aus speziellen Hydrogelen [47] oder Nanofasern [48]. Beladen mit hinzugefügten oder natürlich gebundenen Wachstumsfaktoren oder Stammzellen werden die gerüstartigen Gewebe auf die geschädigten Areale aufgebracht. Zu den regenerativ wirkenden Mechanismen zählen hierbei die Stimulation ortsständiger Zellen als auch die Rekrutierung von regenerativ wirkenden Zellen aus der Umgebung.

Eine der schwierigsten Aufgaben im Bereich des kardiovaskulären *Tissue Engineering* besteht in der Herstellung eines menschenähnlichen Herzens mittels biotechnologischer Verfahren. Seit den Errungenschaften von Taylor und Ott im Jahre 2008, die erstmals die Tür zu dieser verheißungsvollen Zukunft im Bereich des *Tissue Engineering* des Herzens aufgestoßen haben, versuchen Arbeitsgruppen auf der gesamten Welt, den Traum vom „Herzen aus dem Reagenzglas“ zu verwirklichen. Der Arbeitsgruppe von Taylor und Ott gelang es nicht nur ein Rattenherz in einem Bioreaktorsystem *in toto* zu dezellularisieren, sondern die resultierende zellfreie EZM erneut mittels neonataler Rattenkardiomyozyten und Endothelzellen zu besiedeln. Binnen 8 Tagen Kultivierung im Bioreaktorsystem unter kontinuierlicher Nährstoffperfusion und anschließender elektrischer Stimulation, konnten makroskopische selbstständige Myokardkontraktionen nachgewiesen werden. Diese rudimentären Kontraktionen ergaben lediglich eine Pumpfunktion von 2 % der adulten Rattenherzen, zeigten jedoch zugleich eindrucksvoll das Potenzial des kardialen *Whole-Organ Tissue Engineering*. [24] Die weitere Entwicklung geeigneter Dezellularisierungsverfahren und Anlagen [35] mit angepassten Spezifikationen für Herzen menschlicher Größe rückte daraufhin in den Fokus des kardiovaskulären *Tissue Engineering*. Um den weiteren Fortschritt zu bereiten, benötigen die komplexen Prozesse im Bereich des *Tissue Engineering* kontrollierbare und vergleichbare äußere Bedingungen. Eigens entwickelte Bioreaktoren in unterschiedlichen Größen und Ausführungen ermöglichen die Kontrolle über Parameter wie Temperatur, pH-Wert, Nährstoffzusammensetzung und viele mehr. Sie bieten die Möglichkeit der Automatisierung und der Modifikation von Kultivierungsstrategien, welche mit zahlreichen, weiterführenden biotechnischen Anwendungen, wie z.B. der elektrophysiologischen oder mechanischen Stimulation von Organen zusätzlich angepasst werden kann. [18][24][49][50]

Zukünftig als Gewebeersatz humaner Dimension denkbar, wären zuvor dezellularisierte und im hoch spezialisierten Bioreaktor mit empfängereigenen Stammzellen besiedelte, humane oder xenogene Spenderherzen. Diese könnten eingesetzt werden als eine maßgeschneiderte Option, um die immungetriggerten Abstoßungsreaktionen und damit eine immunsuppressive Medikation zu vermeiden. [51] [52] Bis zum vollständigen bioartifiziellen Herzersatz müssen jedoch

noch zahlreiche grundlegende, den gesamten Bereich des *Tissue Engineering* betreffende Hindernisse überwunden werden.

1.5 Grenzen und Potenzial des *Tissue Engineering*

Trotz der gewaltigen Fortschritte, die in diesem Forschungsgebiet bereits erreicht wurden, stößt das kardiale *Tissue Engineering* in einigen Gebieten auf bisher noch ungelöste wissenschaftliche Herausforderungen. Insbesondere bei der Nutzung der kardialen *dECM* als Plattform für die regenerative kardiovaskuläre Medizin gibt es noch zahlreiches Optimierungspotenzial und Hindernisse, die es zu überwinden gilt. Eines dieser Hindernisse ist die Frage nach einer geeigneten Nährstoffversorgung funktioneller *dECM*-Konstrukte. So können sich Konstrukte von kleinerer Größe bzw. kleinerem Durchmesser durch Diffusion in das Gewebe versorgen und auf diese Art die Funktion der vorhandenen Zellen innerhalb des Konstruktes sicherstellen. Herzmuskelzellen haben jedoch einen hohen Energie- und Sauerstoffverbrauch, der durch Diffusion nur innerhalb eines Durchmessers von circa 100 µm aufrechterhalten werden kann. [40][53] Dies führt bisweilen dazu, dass die Anwendungsmöglichkeiten von *dECM*-Modellen mit größerem Durchmesser limitiert bleiben, da die Nährstoffversorgung einer geeigneten funktionellen Zellpopulation nicht gewährleistet werden kann. Dringend benötigt wird daher eine adäquate Möglichkeit zur funktionellen Vaskularisierung von *dECM*-Konstrukten. Nur hierdurch ist es möglich, biologische Konstrukte zu erschaffen, die ganze Organfunktionen ersetzen können. Dies könnte beispielsweise durch die funktionelle Re-Endothelialisierung des vorhandenen Gefäßsystems nativer *dECM*-Gerüste erreicht werden. Erste Erfolge konnten hier zum Beispiel von Robertson et al. erzielt werden. Durch Re-Endothelialisierung von *in toto* dezellularisierten Rattenherzen mittels aortalen Rattenendothelzellen senkten Robertson et al. *in vitro* die Thrombogenität im vaskulären System des arteriell und venös re-endothelialisierten *dECM*-Rattenherzmodell. Die Re-Endothelialisierung führte darüber hinaus zu einer stärkeren Kontraktilität des linken Ventrikels im re-besiedelten *dECM*-Rattenherz. Verglichen wurde die Kontraktilität nach vorheriger Besiedlung und Kultivierung mit neonatalen Rattenkardiomyozyten mit und ohne zusätzliche Re-Endothelialisierung. [54] Vielversprechend sind auch die Ergebnisse von Ott et al. (2010), die eine dezellularisierte Rattenlunge erfolgreich mit humanen Nabelschnurvenenzellen (engl.: *Human Umbilical Vein Cells (HUVECs)*) revaskularisierten und eine Besiedlung mit Epithelzellen anschlossen. Es gelang der Gruppe, die im Bioreaktor hergestellte Lunge orthotop in eine Ratte, nach vorheriger linker Pneumonektomie, zu implantieren. Die Ratte zeigte für mehrere Stunden keine Blutungen aus dem Gefäßbett und konnte unter Raumluft ventiliert werden. [22]

Weiteres Verbesserungspotenzial der momentan in der Forschung verwendeten kardialen *dECM*-Ansätze betrifft die Re-Besiedlung der Konstrukte durch funktionelle Zellen. Dies gilt nicht nur bei der Besiedlung des vaskulären Systems, sondern gilt für sämtliche Versuche, eine zuvor dezellularisierte Struktur erneut mit lebenden Zellen zu funktionellen Organen zu formen. Allein die schiere Zahl der benötigten Zellen, die beispielsweise für ein bioartifizielles Herz benötigt würden, stellt diesen Forschungszweig vor große Herausforderungen. So besteht ein Herz aus circa 10^8 Kardiomyozyten/cm³ [55] sowie aus zahlreichen weiteren Zellen mit verschiedensten Aufgaben und Funktionen. Die durchschnittliche Zahl der Zellen, welche mit den heutigen Techniken in ein *dECM*-Konstrukt eingebracht werden können, kann diese gewaltige Anzahl bei Weitem noch nicht erreichen. Umso wichtiger ist es, neue Methoden zu finden, ausreichende Zellzahlen zu kultivieren und mit hoher Effizienz in die *dECM*-Konstrukte einzubringen. Eine Möglichkeit dieses Hindernis anzugehen, verbirgt sich in der Funktionalisierung der EZM-Oberflächen. Eine Anreicherung des Gewebes mit zusätzlichen Chemokinen, Wachstums- und pro-angiogenetischen Faktoren, um eine Verbesserung der Differenzierung, Proliferation und Adhärenz der Zellen zu fördern, könnte einen denkbaren Ansatz verkörpern.

Auch die Steigerung der Adhärenz der Zellen an der *dECM* und somit die Verringerung von zellfreien Arealen in den Konstrukten bietet Optimierungspotenzial. So gibt es bereits im Bereich der Endoprothetik und der Implantatforschung Bestrebungen, eine optimale Integration von Fremdmaterial im Körper mittels spezieller Beschichtungen zu fördern. [56] Hier gilt es, die bereits gesammelten Erfahrungen zu nutzen und den gemeinsamen Mehrwert in den Bereich des kardiovaskulären *Tissue Engineerings* zu übertragen. Auch im Feld der kardiovaskulären Erforschung von *dECM*-Konstrukten wurden bereits erste Erfolge erzielt. So ersetzte Flameng et al. (2014) im Schafsmodell erfolgreich die Pulmonalklappen mit zuvor dezellularisierten und mit Fibronectin sowie *Stromal Cell Derived Factor* beschichteten Aortenklappen. Die beschichteten Aortenklappen zeigten eine signifikant verbesserte Endothelialisierungsrate als die Kontrollgruppe. Des Weiteren zeigte sich durch die Beschichtung eine verminderte Kalzifizierungsrate sowie eine geringere Immunreaktion. [57] Eine schnellere Endothelialisierung hat wesentliche positive Eigenschaften auf die Biokompatibilität eines Implantats. So ist es nicht verwunderlich, dass es durchaus einen wesentlichen Bedarf an Oberflächenoptimierung im Bereich des *Tissue Engineering* von Herzklappen gibt. Denn obwohl die klinische Anwendung von dezellularisierten Herzklappen bereits im Jahre 2006 gute Ergebnisse lieferte [20][58], offenbarten sich anhand einiger Fälle von frühen Transplantatabstoßungsreaktionen noch deutlicher Optimierungsbedarf. Die Implantate zeigten dabei vor allem unerwünschte Immunreaktionen, einerseits durch verbleibende Antigene des Spenders durch unzureichende Dezellularisierungsverfahren. Oder auf-

grund von immunologischen Abstoßungsreaktionen mit erhöhter inflammatorischer Aktivität durch Makrophagen und Granulozyten bei der Verwendung von xenogenen Implantaten durch das *alpha-Galctosyl-Epitop*. Schweine, Schafe und auch die meisten anderen Säugetiere exprimieren diese Epitope. Menschen allerdings besitzen natürliche Antikörper gegen das *alpha-Gal-Antigen*, welche erfolgreiche Xenotransplantationen bisher verhinderten. Starke Kalzifikationen des Implantats, die zu Funktionsverlusten der Klappen führen und eine erhöhte Thrombogenität durch die Klappen selbst wurden ebenfalls beobachtet. [59][60][61][62] Um den genannten Problemen entgegenzuwirken ist es von großer Bedeutung, die autologe Endothelialisierung des Implantats zu verbessern. Dazu zählen die schnellere sowie die vollständigere Besiedlung mit eigenen Endothelzellen.

Besonders im Bereich des *Whole-Organ Tissue Engineering* vereinigen sich zahlreiche der genannten Hindernisse in besonderem Maße. Die Größenverhältnisse und die biofunktionelle Komplexität lebenswichtiger Organe wie sie Lunge, Niere, Leber oder auch Herz ausbilden, ermöglichten es bisher nicht, diese im Sinne des *Tissue Engineering* als funktionellen Organersatz nachzubilden.

Als mögliche Grundlage für den humanen Organersatz gelten im *Whole-Organ Tissue Engineering* Herzen tierischen Ursprungs, dem menschlichen, in Physiologie und Größe entsprechender Spezies, wie zum Beispiel Schaf oder Schwein. Ein großer Vorteil dieser Tiere besteht in der Einfachheit der Haltung und Zucht. Auch haben diese Tiere eine lange Tradition als Nutz- und Schlachttiere, sodass eine Generierung von bioartifiziellen Organen aus Zuchttieren nach ethischen Maßstäben eventuell möglich wäre. Eine kommerzielle Zucht der dem Menschen nächsten Verwandten, den Primaten, wäre in diesem Kontext ethisch vergleichsweise problematisch. Auch wenn sie entscheidende Vorteile gegenüber anderen Säugetieren bieten würde. So fehlen Primaten, analog zum *Homo sapiens sapiens*, aufgrund diverser genetischer Ausstattungsmerkmale die *alpha-Galctosyl-Epitope*. [63] Entsprechende Dezellularisierungsverfahren an Großtiermodellen, wie sie bereits in der Vergangenheit zum Beispiel an Herzen etabliert werden konnten, müssen daher auch nach ihrer Freiheit an Xenoantigenen beurteilt werden. [64][65] Eine der wohl schwierigsten bevorstehenden Aufgaben besteht sicher darin, geeignete Methoden zur adäquaten zellulären Wiederbesiedlung von komplexen dezellularisierten Organen zu entwickeln.

Denn die schiere Größe, beispielsweise eines menschengroßen Herzens stellt die Wissenschaft vor logistische Herausforderungen, bereits die benötigte Zellzahl mit den gängigen Methoden bereitzustellen. Darüber hinaus besteht ein Herz aus vielen unterschiedlich agierenden Zellty-

pen, die in unterschiedlicher Konzentration vorhanden sein müssen, um ein funktionstüchtiges Organ darzustellen. Die richtige Zusammensetzung der Bestandteile eines lebenden Organs exakt nachzubilden bleibt damit weiterhin eine große Aufgabe.

Nicht außer Acht zu lassen ist die Bedeutung einer möglichst kostenoptimierten Lösung, um die Methoden in Zukunft möglichst vielen Menschen zur Verfügung stellen zu können. Eine ständige Verbesserung der Dezellularisierungsmethoden und Protokolle ist in Bezug auf Schnelligkeit, Effizienz und Ressourcenverbrauch weiterhin ein aktueller Forschungsschwerpunkt.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit befasst sich mit neuen Optimierungskonzepten in drei Kernbereichen des kardiovaskulären *Tissue Engineerings*, die dabei helfen sollen die aktuellen wissenschaftlichen Hürden in diesem Bereich zu überwinden. Im Mittelpunkt der Dissertation steht dabei die dezellularisierte kardiale EZM, die somit als Plattform für den klinischen Einsatz von *tissue-engineerten* Geweben und Organen in der kardiovaskulären Medizin genutzt werden könnte.

Hierbei sollten neue Lösungsansätze in drei relevanten Fragestellungen wissenschaftlich erprobt und evaluiert werden:

1. Die selektive Re-Endothelialisierung des Gefäßsystems von dezellularisierter kardialer EZM als Voraussetzung für eine funktionelle Vaskularisierung von *tissue-engineerten* Geweben und Organen.
2. Die Biofunktionalisierung der Oberfläche von dezellularisierter kardialer EZM zur verbesserten *in vitro* und *in vivo* Zell-Matrix-Interaktion.
3. Die Herstellung von dezellularisierten kardialen EZM-Konstrukten humaner Dimensionen, um einen klinischen Einsatz zu ermöglichen.

Konkret sollte hierzu:

1. Das Gefäßsystem von dezellularisierter myokardialer Ratten-EZM selektiv mit humanen Endothelzellen re-endothelialisiert und auf seine Funktionalität hin untersucht werden.
2. Die Oberfläche von dezellularisierten ovinen Herzklappensegeln mit eigens hergestellten bioaktiven Peptiden funktionalisiert und der Einfluss der gezielten Oberflächen-Funktionalisierung auf die Adhärenz von humanen Endothelzellen *in vitro* untersucht werden.
3. Die Möglichkeit der Herstellung von *human-size* EZM-Gerüsten durch die perfusionsbasierte *in toto* Dezellularisierung von ovinen Herzen anhand der Modifizierung eines etablierten Protokolls zur Kleintierherz-Dezellularisierung untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Organentnahme und Präparation

Original Perfusor Syringe 50 ml	Braun, Melsungen, Art.-Nr.: 8728852F
Chirurgisches Nahtmaterial, 3-0 Prolene monofil	Ethicon, Norderstedt, Art.-Nr.: Eh7694H
Heparin-Natrium-25000-Ratiopharm	Ratiopharm, Ulm, Zul.Nr.: 5394.02.00
Ketaminhydrochlorid, Ketavet	Bayer, Leverkusen, Zul.Nr: 61879260000
Xylazinhydrochlorid 2 %, Rompun	Bayer, Leverkusen, Zul.Nr: 62938410000

2.2 Dezellularisierung und Detergenzien

1 Liter Vorratsflasche, Schott Duran	Schott, Mainz, Art.-Nr.: 21 801 54 5
2 Liter Vorratsflasche, Schott Duran	Schott, Mainz, Art.-Nr.: 21 801 63 5
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, Art.-Nr. K305.2
Desoxycholsäure, DCA	Merck, Darmstadt, Art.-Nr.: 106504
Sodiumdodecylsulfate, SDS Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, Art.-Nr.: CN-30.4
Triton X 100	Sigma Aldrich, München, Art.-Nr.: T9284-500ML
Venenverweilkanüle Vasofix Safety Gr.: 17G	Braun, Melsungen, Art.-Nr.: 4268156S-01
0,25 % Trypsin-EDTA 100 ml	Gibco by Life Technologies, Darmstadt Art.-Nr.: 25200056
Penicillin/Streptomycin 100 ml	Gibco by Life Technologies, Darmstadt Art.-Nr.: 15140122
L-Glutamine 200 mM 100 ml	Gibco by Life Technologies, Darmstadt Art.-Nr.: 25030024
Betasisadona, Povidon-Iod	Mundipharma, Limburg

2.3 Histologie und Immunhistologie

Alcianblau	Sigma Aldrich, München, Art.-Nr.: A3157-10G
Briliant-Crocein-R	Waldeck, Münster, Art.-Nr.: 1B-109
Eisessig 100 %, Suprapur	Merck, Darmstadt, Art.-Nr.: 100066
Essigsäure 96 %, Emprove	Merck, Darmstadt, Art.-Nr.: 100058
Eosin G	Carl Roth, Karlsruhe, Art.-Nr.: 7089.1

Ethanol 70 %, 96 %, 100 %	Zentralapotheke, Universitätsklinikum Düsseldorf
Formaldehyd 37 %, Rotipuran	Carl Roth, Karlsruhe, Art.-Nr.:4979.1
Formaldehyd 4 %, Roti Histofix	Carl Roth, Karlsruhe, Art.-Nr.:P087.5
Eisen-Chlorid-Hexahydrat	Sigma Aldrich, München, Art.-Nr.:236489
Hämatoxylin	Sigma Aldrich, München, Art.-Nr.:H3136-25G
Natriumthiosulfat	Sigma Aldrich, München, Art.-Nr.: 72049-250G
Pikrinsäure	Sigma Aldrich, München, Art.-Nr.:197378-500G
Phosphorwolframsäure	Sigma Aldrich, München, Art.-Nr.:P4006-250G
Salzsäure rauchend, konzentriert	Carl Roth, Karlsruhe, Art.-Nr.: 2607.1
Säurefuchsin, 25 g	Waldeck, Münster, Art.-Nr.: 1B-525
Safran du Gatinais	Waldeck, Münster, Art.-Nr.: 5A-394
Tween 20, Calbiochem	Merck, Darmstadt, Art.-Nr.:655205
Xylol	VWR Chemicals, Braunschweig, Art.-Nr.: 28975
Wetzlar Cryotom, Modell CM1950	Leica, Wetzlar
Objektträger Super Frost Plus	R. Langenbrink, Emmendingen, Art.-Nr.: 03-0060
Objektträger	Marienfeld, Lauda Königshofen, Art.-Nr.: 08 100 00
Deckgläser	Engelbrecht GmbH, Edermünde, Art.-Nr.: k12450
Eindeckmedium	Roti HistoKitt, Carl Roth, Karlsruhe Art.-Nr.: 6638.1
Fettstift (DAKO-Pen)	DAKO, Agilent, St. Clara, CA, USA Art. Nr.: S2002
Frozen Tissue Medium, CryoCompound	Klinipath, Duiven, Niederlande, Art.-Nr.: 1620C
Einbettschalen	Medite, Burgdorf, Art.-Nr.: 48-6302-00
Leica DM 2000 Durchlichtmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop DMIL LED	LEICA, Wetzlar
Fluoreszenzlampe DFC425C	LEICA, Wetzlar

Konfokalmikroskop, LSM 700

Carl Zeiss, Jena

Mikrotom, Modell 2035

Reichert-Jung, Leica, Wetzlar

2.4 Antigene

Goat anti mouse antikörper IgG

Invitrogen by Life Technologies, Darmstadt

Alexa fluor 488

Art.-Nr.: A11029

Anti-Human-vWF-Antikörper, polyklonal

DAKO, Agilent, St. Clara, CA, USA

Art.-Nr.: A0082

Anti-Human-CD31-Antikörper, Rabbit unkonj.

Abcam, Cambridge, UK Art.-Nr.: ab32457

Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit

Life Technologies, Darmstadt, Art.-
Nr.: L3224

Rhodamine Phalloidin

Life Technologies, Darmstadt

Dapi Vectashield

Vector Laboratories, Burlingame, USA,
Art.-Nr.: H1200

2.5 Molekularbiologie

RNEasy Mini Kit

Qiagen, Hilden, Art.-Nr.:74106

QuantiTect® Reverse Transcription Kit

Qiagen, Hilden, Art.-Nr.: 205310

GoTaq® qPCR Master Mix

Promega, Mannheim, Art.-Nr.: A6002

β-Mercaptoethanol

Sigma Aldrich, München, Art.-Nr.: M7154

RNase-Away

VWR Chemicals, Darmstadt, Art.-Nr.:7003

Thermocycler T 3000

Biometra, Göttingen

Rt-PCR System, StepOnePlus

Applied Biosystems, Life Technologies,
Darmstadt

2.6 Re-Endothelialisierung und *Tissue-Flap*-Präparation (Zellkultur)

Endothelial Cell Growth Medium

Promo Cell, Heidelberg, Art.-Nr.: C-22010

Supplement Mix

Promo Cell, Heidelberg, Art.-Nr.: C-39215

Titan Haemostatic Clips

Vitalitec, Plymouth, USA, Art.-Nr.: J1180-1

Chirurgisches Besteck

Aesculap by Braun, Melsungen

Neubauer Zählkammer

Marienfeld, Lauda-Königshofen

2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Steritopfilter	Millipore Corp., Merck, Darmstadt Art.-Nr.: SCGPT05RE
5 ml Spritze	Braun, Melsungen, Art.-Nr.: 4606051V
10 ml Spritze	Braun, Melsungen, Art.-Nr.: 4606108V
20 ml Spritze	Braun, Melsungen, Art.-Nr.: 4606205V
50 ml Spritze	Braun, Melsungen, Art.-Nr.: 8728852F
DPBS 500 ml	Gibco by Life Technologies, Darmstadt Art.-Nr.: 14190-094
Aqua dest., Ecotainer	Braun, Melsungen, Art.-Nr.: 0082479E
Sterile Latex Handschuhe, Semper Med	Semperit, Wien, Art.-Nr.: 822751721
Nitra-Tex Handschuhe, Micro Touch	Ansell, München, Art.-Nr.: 700113
Jonosteril Infusionslösung 500 ml	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Zul.-Nr.: 61002850000
OP-Abdecktuch	L&R, Rengsdorf, Art.-Nr.: 33010
CytoOne Petrischale, steril 100 x 20 mm	Starlab, Hamburg, Art.-Nr.: CC7672-3394
10 µl Graduated, Filter Tip, TipOne	Star Lab, Hamburg, Art.-Nr.: S1121-3810
20 µl Bevelled Filter Tip	Star Lab, Hamburg, Art.-Nr.: S1120-1810
100 µl Bevelled Filter Tip (Sterile)	Star Lab, Hamburg, Art.-Nr.: S1120-2810
200 µl Graduated Filter Tip (Sterile)	Star Lab, Hamburg, Art.-Nr.: S1123-1840
1000 µl Filter Tip (Sterile)	Star Lab, Hamburg, Art.-Nr.: S1120-9810
CytoOne, 6-Well Plate	Starlab, Hamburg, Art.-Nr.: CC7672-7506
Zellkulturflasche (T-225cm ²), Cellstar	Greiner Bio One, Frickenhausen, Art.-Nr.: 353139
Zellkulturflasche (T-75cm ²), Cellstar	Greiner Bio One, Frickenhausen, Art.-Nr.: 658175
50 ml FalconTubes,	Sarstedt, Nümbrecht Art.-Nr.: 62559001
50 ml Falcon CellStar Tubes,	Greiner Bio One, Frickenhausen Art.-Nr.: 227261
Zentrifugengefäß, 2,0 ml	Kisker Biotech, Steinfurt, Art.-Nr.: G053BP
Zentrifugengefäß 1,5 ml	Kisker Biotech, Steinfurt, Art.-Nr.: G052BP
Cryotubes, 2,0 ml	VWR, Darmstadt, Art.-Nr.: 479-1262
Stripetten 5 ml	Corning, Massachusetts, Art.-Nr.: 4487
Stripetten 10 ml	Corning, Massachusetts, Art.-Nr.: 4488

Stripette 25 ml	Corning, Massachusetts, Art.-Nr.: 4489
0,45µl Minisart Filter	Sartorius, Göttingen, Art.-Nr.: 16555
HeraSafeKS 18, Sterilbank	Thermo Scientific, Braunschweig Art.-Nr.:51022712
Chirurgisches Nahtmaterial, 5-0 PDS II monofil	Ethicon, Norderstedt, Art.-Nr.:Z863
Chirurgisches Nahtmaterial, 3-0 Prolene monofil	Ethicon, Norderstedt, Art.-Nr.:Eh7694H
Chirurgisches Nahtmaterial, 4-0 Prolene monofil	Ethicon, Norderstedt, Art.-Nr.: Eh7411
Pipettierhelfer Accu Jet pro,	BRAND, Wertheim
Zentrifuge, Heraeus Sepatech Megafuge 10	Thermo Scientific, Braunschweig
Brutschrank, HERA Cell 240i	Thermo Scientific, Braunschweig
Zentrifugen Universal 16	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Labofuge 300	Thermo Scientific, Braunschweig
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Mini-Zentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe
Waage BP 110 S	Sartorius, Göttingen
Wärmebad 1092	GFL, Hannover
Autoklav VX-95	Systec, Wettenberg
Saugpumpe Laboport	KNF Lab, New Jersey
NanoDrop1000	Thermo Scientific, Braunschweig

2.8 Technische Anlagen

2.8.1 Automatisierte, softwaregesteuerte perfusionsbasierte Dezellularisierungsanlage

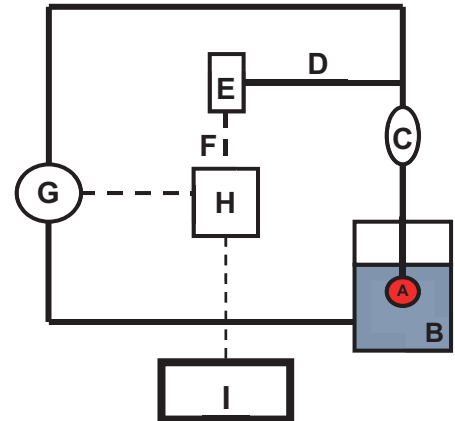
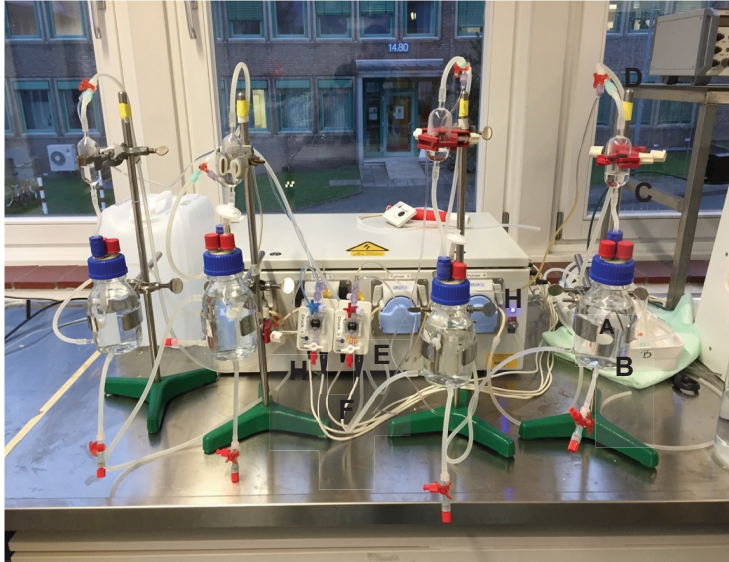


Abb. 1: Originalaufbau der Dezellularisierungsanlage 2 und Schemazeichnung

Ansicht eines exemplarischen Perfusionskreislaufs der Dezellularisierungsanlage 2 mit vier Perfusionsgefäßen und der zugehörigen Schemazeichnung während des laufenden Dezellularisierungsprozesses. (A) Organ; (B) Perfusionsgefäß mit Perfusat; (C) Luftfalle; (D) Schlauchsystem/Verbindungsstück; (E) Druckmesser; (F) Kabelverbindung; (G) Rollerpumpe; (H) Messwerterfassung und Steuerung; (I) Notebook.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *in toto* Dezellularisierung von Rattenherzen wurden mit der in **Abb. 1** dargestellten institutseigenen Dezellularisierungs- und Langzeitperfusionsanlage vorgenommen. Dabei handelt es sich um eine automatisierte und softwaregesteuerte Pumpenanlage mit dazugehörigem Schlauchsystem und Perfusionsgefäß. Einen entsprechenden schematischen Aufbau zeigt ebenfalls **Abb. 1**. Zur Umwälzung der Flüssigkeit und dem Druckaufbau innerhalb des Systems wurden je 4 Rollerpumpen pro Anlage genutzt. Diese ermöglichten es, automatisiert und softwaregesteuert, innerhalb eines geschlossenen Kreislaufs das eingespannte Organ steril zu perfundieren. Gesteuert wurden jeweils vier Pumpen parallel auf einem Windows XP basierten Notebook mit einer speziell für diesen Zweck entwickelten Software, das entsprechende Softwarekontrollfeld zeigt der Screenshot in **Abb. 2**. Die Software wurde in Zusammenarbeit mit der *engineo GmbH* (engineo GmbH, Ginsheimer Str. 1, D-65462 Gustavsburg, Deutschland, HR Groß-Gerau: HRB 4502, Geschäftsführer: Dipl.-Ing. Dr. Karlheinz Preuß, USt.-ID-Nr.: DE 813 223 543) bereits für frühere Projekte der Arbeitsgruppe entwickelt und für diese Arbeit angepasst.

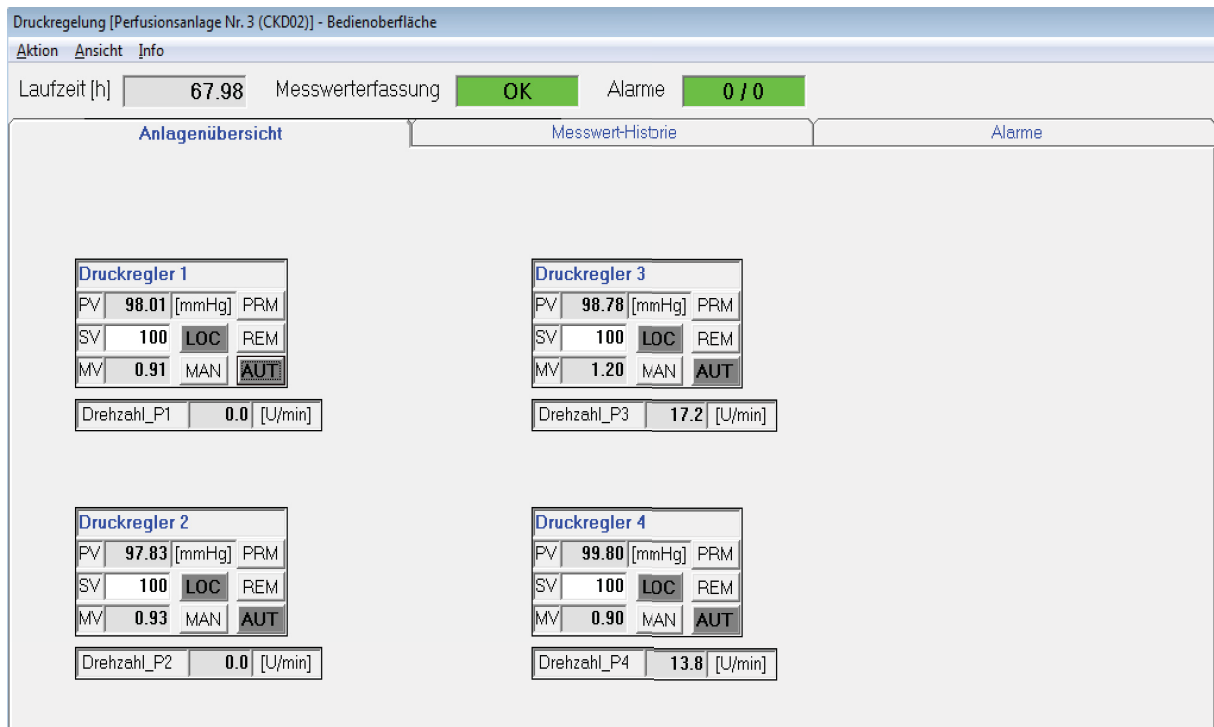


Abb. 2: Screenshot des Steuerungssystems und Drucküberwachung der Perfusionsanlage

Benutzeroberfläche der Steuerungs- und Aufzeichnungssoftware. Echtzeitwerte des Soll- und Ist-Perfusionsdruck und der Pumpendrehzahl. Mit der Möglichkeit zur manuellen und automatisierten Anpassung und Aufzeichnung des Perfusionsdrucks und der Flussrate über die angeschlossenen Rollerpumpen.

2.8.2 Perfusionskammer und Schlauchsystem

Alle Herzen wurden in einem eigens konzipierten Schlauchsystem mit angeschlossenem Perfusionsgefäß dezellularisiert. Das Perfusionsgefäß besteht aus einer 250 ml Schott Laborflasche, welche mit einem speziellen Verschluss ausgestattet ist (**Abb. 3a**: K, I, G, H). Das Schlauchsystem ist mit Konnektoren zum Durchtritt durch den Gefäßdeckel (**Abb. 3a**: H) und einem Ausgleichsventil (**Abb. 3a**: G) versehen.

Das Ventil ist, um die Sterilität zu wahren, mit einem Filter (**Abb. 3a**: E; Porengröße 25 μm) ausgestattet und dient vornehmlich dazu den Austausch des Perfusats zu erleichtern. Das Schlauchsystem endet im Perfusionsgefäß in einem Luer-Lock-Konnektor, welcher sich frei flotierend im Gefäß befindet. An diesen Konnektor wird das zu dezellularisierende Organ angeschlossen und die Flasche soweit gefüllt, dass das Organ vollständig mit Flüssigkeit bedeckt ist. (**Abb. 3a**: B) Das Perfusionsgefäß verfügt über zwei weitere Anschlüsse am Boden der Flasche. An einem Anschluss befindet sich der Ablassschlauch (**Abb. 3a**: M), der sowohl dem sterilen Entleeren als auch dem Füllen der Flasche mithilfe des Befüllungssystems (**Abb. 3c**) dient. Der zweite Anschluss stellt die erneute Verbindung zum Schlauchsystem her, von welchem das Perfusat abgezogen wird, um es erneut in den Kreislauf einzuspeisen. Ein spezieller Schlauchabschnitt im weiteren Lauf wird benötigt, um den Schlauch in die Rollerpumpe ein-

zuspannen, er besteht aus widerstandsfähigem Material, um den erhöhten Scherkräften zu widerstehen. (**Abb. 3a: J**) Um den Druck im System kontinuierlich verfolgen zu können, ist dem Perfusionsgefäß ein 3-Wege-Hahn mit Verbindungsschlauch zu einem Druckmessgerät vorgeschaltet. Von hier aus werden die Daten mittels Kabelverbindung zur Messerfassung und weiter zur Software geleitet. (**Abb. 3a: B, C, F**) Ein Ablassschlauch zur Spülung ist ebenfalls vorhanden. (**Abb. 3a: L**) Bevor das Perfusat zur Organperfusion gelangt, wird durch eine Blasenfalle (**Abb. 3a: D**) gewährleistet, dass keine Luft in das Gefäßsystem des Herzens gelangen kann. Um das gesamte System steril mit Perfusat zu füllen, wurden jeweils gefüllte 1 L-2 L Schott Duran Glasflaschen (**Abb. 3c: A**) im Autoklav sterilisiert und mit einem ebenfalls sterilisierten Befüllungsverschluss versehen. Dieser besteht aus einem Schraubverschluss, durch den ein Schlauch geführt wurde (**Abb. 3c: C, D, F**) sowie einem Ventil mit Filter (25 µm Porengröße) (**Abb. 3c: E**) um den Luftaustausch zu ermöglichen. Ein 3-Wege-Hahn (**Abb. 3c: B**) dient der Verbindung zum Perfusionsgefäß. Mit dieser Vorrichtung war es möglich, die Flüssigkeit steril in jedes Perfusionsgefäß zu infundieren.

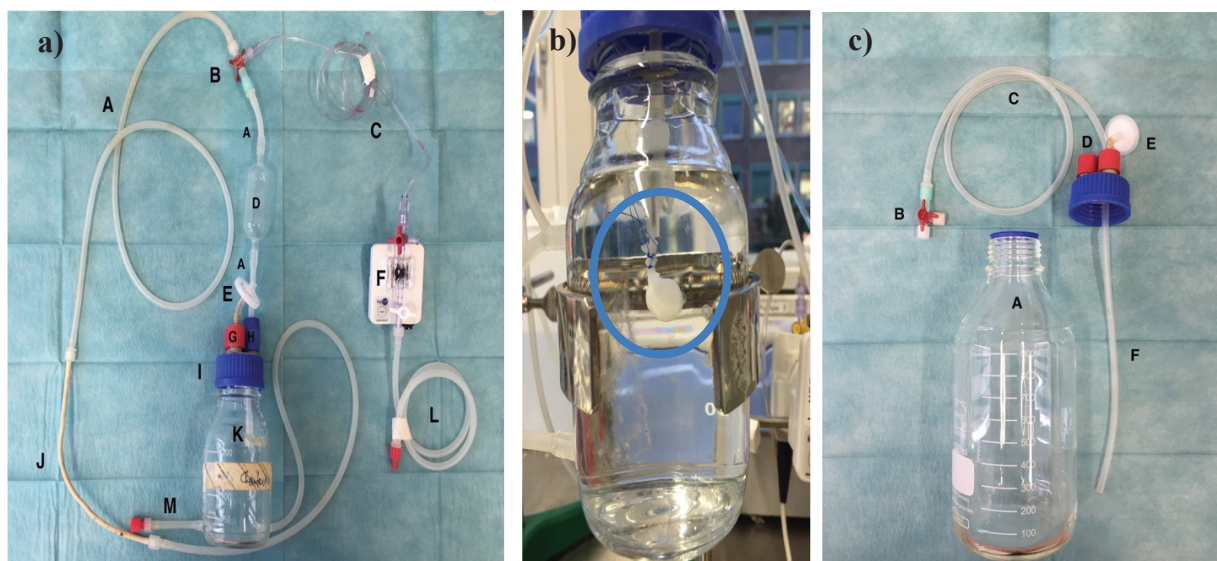


Abb. 3: Anordnung und Detailansicht des eigens konzipierten Schlauchsystems zur sterilen Befüllung und Wechsel des Perfusats während des Dezellularisierungsvorgangs

a) Perfusionskammer und Schlauchsystem

(A) Silikonschlauch, Verbindungsstücke; (B) 3-Wege-Hahn; (C) Kunststoffschlauch; (D) Blasen-/Luftfalle; (E) Luftfilter (25 µm); (F) Druckmessgerät; (G) Verschlusskappe mit Aufnahme für den Luftfilter; (H) Verschlusskappe mit Aufnahme für den Perfusionsschlauch; (I) Kunststoffdeckel mit Verbindungsstücken; (J) Schlauch zum Einspannen in die Rollpumpe; (K) Perfusionsgefäß und Konnektionsstück (Luer-Lock) für das das Organ; (L) Auslass- und Druckausgleichsschlauch; (M) Ablassschlauch; (N) Abflussverbindung.

b) Perfusionsgefäß gefüllt, mit konnektiertem und dezellularisiertem Rattenherz

c) Befüllungssystem

(A) Schott Duran 1 L Flasche; (B) 3-Wege-Hahn; (C) Silikonschlauch außen; (D) Verschluss mit Schlauchdurchtritt; (E) Ventil mit Luftfilter; (F) Silikonschlauch innen.

2.8.3 Disc-System zur *in vitro* Besiedlung und Biofunktionalisierung

Zur Biofunktionalisierung von ovinen Herzklappensegeln wurde ein eigens angefertigtes Disc-System verwendet, das ursprünglich für die kontrollierte Zellbesiedlung von dezellularisierten Herzklappen konzipiert worden war. [66] Die in dieser Arbeit verwendete Variante des Disc-Systems besteht aus 12 nach oben und unten geöffneten Acrylglaszylindern, die mit einem Füllungsvolumen von ca. 300 µl den Reaktionsraum darstellen und in eine runde Aluminiumdisc eingelassen sind. (Abb. 4: B) Diese Top-Komponente wird mittels einer vierkantigen Mulde auf die entsprechende Basis-Disc passend aufgesetzt. (Abb. 4: A) Die Basis-Disc enthält Aussparungen, die in Glasplättchen eingelassen sind, welche als Boden der Reaktionskammer dienen und diesen abschließen, sodass eine kontinuierliche optische Kontrolle der Reaktionskammer jederzeit möglich ist. Die verwendeten ECM-Proben werden durch die Zylinder auf den Glasplättchen fixiert und eine definierte Reaktionsfläche geschaffen. Die Füllung des Reaktionszylinders erfolgt über die offene Top-Komponente, diese wird mithilfe der Unterlegscheibe (Abb. 4: D) und Schraube (Abb. 4: C) auf der Basis-Komponente montiert. Der durch die Schraube und Unterlegscheibe erzeugte Anpressdruck schließt das Reaktionsgefäß flüssigkeitsdicht ab. (Abb. 4: F)

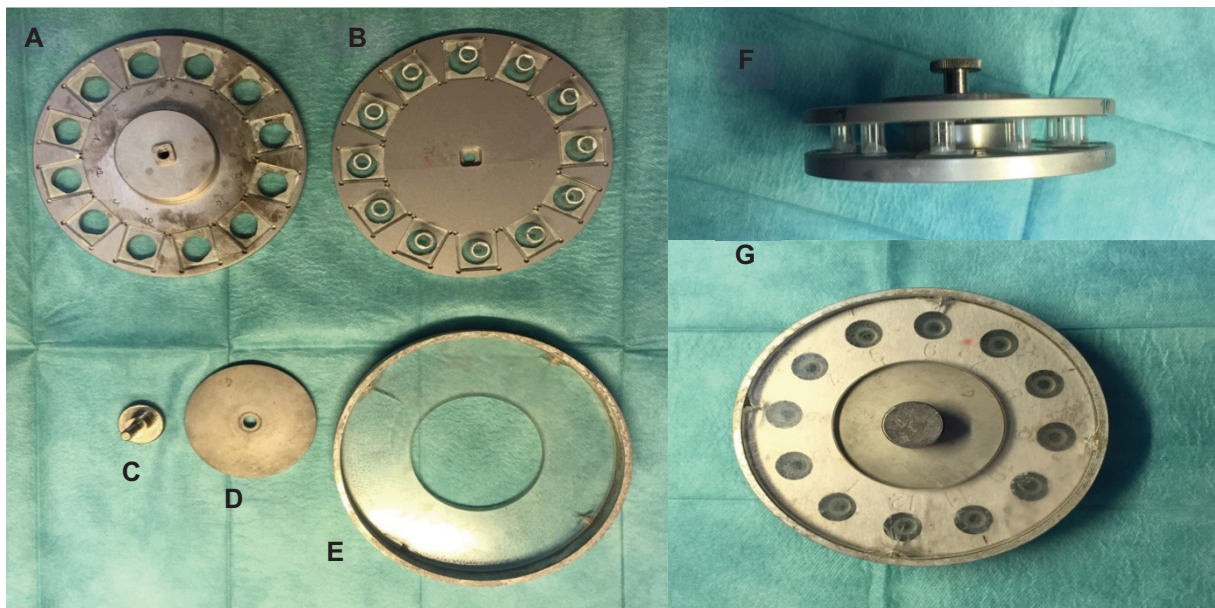


Abb. 4: Disc System zur Biofunktionalisierung

Ansicht der einzelnen und zusammengesetzten Komponenten des Disc System wie es zur sterilen Biofunktionalisierung von ovinen Pulmonalklappensegeln und den Adhärenzversuchen genutzt wurde.

- (A) Bodenplatte aus Aluminium und Glas;
- (B) Deckplatte aus Aluminium und Reaktionszylinder aus Kunststoff;
- (C) Verschlussschraube aus Aluminium;
- (D) Unterlegscheibe aus Aluminium;
- (E) Schutzabdeckung aus Kunststoff;
- (F) Discsystem Seitenansicht geschlossen;
- (G) Discsystem geschlossene Ansicht von oben.

Um Kontaminationen zu vermeiden, kann ein weiteres Acryl-Aluminium-Modul aufgesetzt werden, welches die Disc oberflächlich verschließt, jedoch den Gasaustausch z.B. in einem Zellinkubator nicht behindert. Alle verwendeten Materialien sind vollständig und separat mit einem Dampf-Autoklaven bei 121 °C sterilisierbar.

3 Methoden

3.1 Spendertiere, Herzentnahme und Präparation

3.1.1 Spendertiere und Präparation der Rattenherzen

Im Rahmen der Dissertation wurde durch den Doktoranden der Fachkundenachweis gemäß § 9 des Tierschutzgesetzes über die Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität (Direktor: PD Dr. med. vet. Martin Sager) erworben. Hierzu wurde der entsprechende 40-stündige versuchstierkundliche Einführungskurs für wissenschaftliche Mitarbeiter, Doktoranden und Studenten erfolgreich absolviert.

Als Spendertiere für die *in toto* Dezellularisierung von Rattenherzen dienten ausschließlich gesunde männliche Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht zwischen 350 und 450 g. Alle Versuchstiere wurden über die Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen. Sämtliche Organentnahmen wurden gemäß dem durch das LANUV NRW (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Leibnizstraße 10, 45659 Recklinghausen) genehmigten Organentnahmeantrages (Aktenzeichen A/224/2009) durchgeführt.

Die vorgenommenen Rattenherzentnahmen fanden im Kleintier Operationssaal im Institut für experimentelle Chirurgie der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie des Universitätsklinikum Düsseldorf statt und wurden nach den bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Standards durchgeführt. [38][67] Die verwendeten Ratten wurden zunächst mittels Isofluran narkotisiert und mittels Isofluran/O₂ Gemisch beatmet. Es folgte die Analgosedierung mithilfe von Ketanest 0,4 ml/Xylazin 0,2 ml intraperitoneal. Durch einen senkrechten, abdominalen Schnitt wurden die *Vena cava* und die *Aorta abdominalis* freigelegt und über eine Punktion der *Vena cava* eine Heparinisierung mit 0,2 ml einer 5000 I.E./ml Heparin-NaCl-Lösung durchgeführt. Nach einer Verteilungs- und Metabolisierungszeit von 5 Minuten wurde die Ratte unter Narkose durch eine Inzision der Aorta und *Vena cava* euthanasiert. Die Explantation des Herzens erfolgte über eine mediane Sternotomie.

3.1.2 Spendertiere und Präparation der Lammherzen

Für die *in toto* Dezellularisierung der ovinen Herzen wurden die Herzen von 20-25 kg schweren Lämmern verwendet, welche aus einem Schlachthof (Schlachthof Laame, Buchenhofen 26, 42329 Wuppertal) bezogen wurden. Alle verwendeten Herzen wurden direkt nach der fachgerechten Schlachtung der Tiere durch den Betrieb Laame mit intaktem Perikard an unser Team übergeben.

Noch vor Ort wurde eine erste Spülung der Koronargefäße mittels 500 ml Heparin-Ionosteril-Lösung (10.000 Einheiten Heparin/L) gemischt mit Streptokinase (10.000 Einheiten Streptokinase/L) durchgeführt. Anschließend wurden die Lammherzen auf Eis gelagert und von Wuppertal nach Düsseldorf transportiert, wo die Herzen im Institut für experimentelle Chirurgie präpariert wurden.

Im ersten Schritt wurde der Herzbeutel komplett entfernt und das Herz freigelegt. Anschließend wurde die Aorta und die *A. pulmonalis* gekürzt und unter Sicht die Koronarostien der Herzkranzgefäße sowie der *Sinus coronarius* aufgesucht und je mit 100 ml Jonosteril-Heparin-Lösung gespült. Dazu wurden spezielle Koronarkatheter mit einer ballonierten Spitze in die Koronarostien eingebracht und befestigt, welche mit ihrem Konus das Ostium abdichten und ein verlustfreies Einspülen von Dezellularisierungslösung erlaubten. Falls das Protokoll eine zusätzliche Perfusion des *Sinus coronarius* vorsah, wurde dies nach derselben Methode mit einem Retroplegie-Katheter durchgeführt. Anschließend wurde das Herz an der Aorta hängend in eine Dezellularisierungskammer eingespannt. Die perfusionsbasierte Dezellularisierung erfolgte dabei über antegrade Koronarperfusion und gegebenenfalls über retrograde Perfusion des *Sinus coronarius*. [68]

3.1.3 Präparation der ovinen Pulmonalklappen

Für die Präparation oviner Pulmonalklappen wurden frische Schafsherzen aus einem regionalen Schlachthof verwendet. Die Präparation erfolgte mit chirurgischem Besteck. Als Erstes wurde das Perikard eröffnet und das Herz freigelegt. Der *Apex cordis* wurde abgetrennt und durch weitere Schnitte der rechte Ventrikel isoliert. Die gesamte Pulmonalklappe wurde anschließend, um die Klappensegel zu schonen, mit angrenzendem Myokard und Ausflusstrakt *in toto* reseziert. Besondere Beachtung galt der Unversehrtheit des Anulus fibrosus und der gesamten Taschenarchitektur, wie beispielhaft anhand **Abb. 5** zu sehen ist.

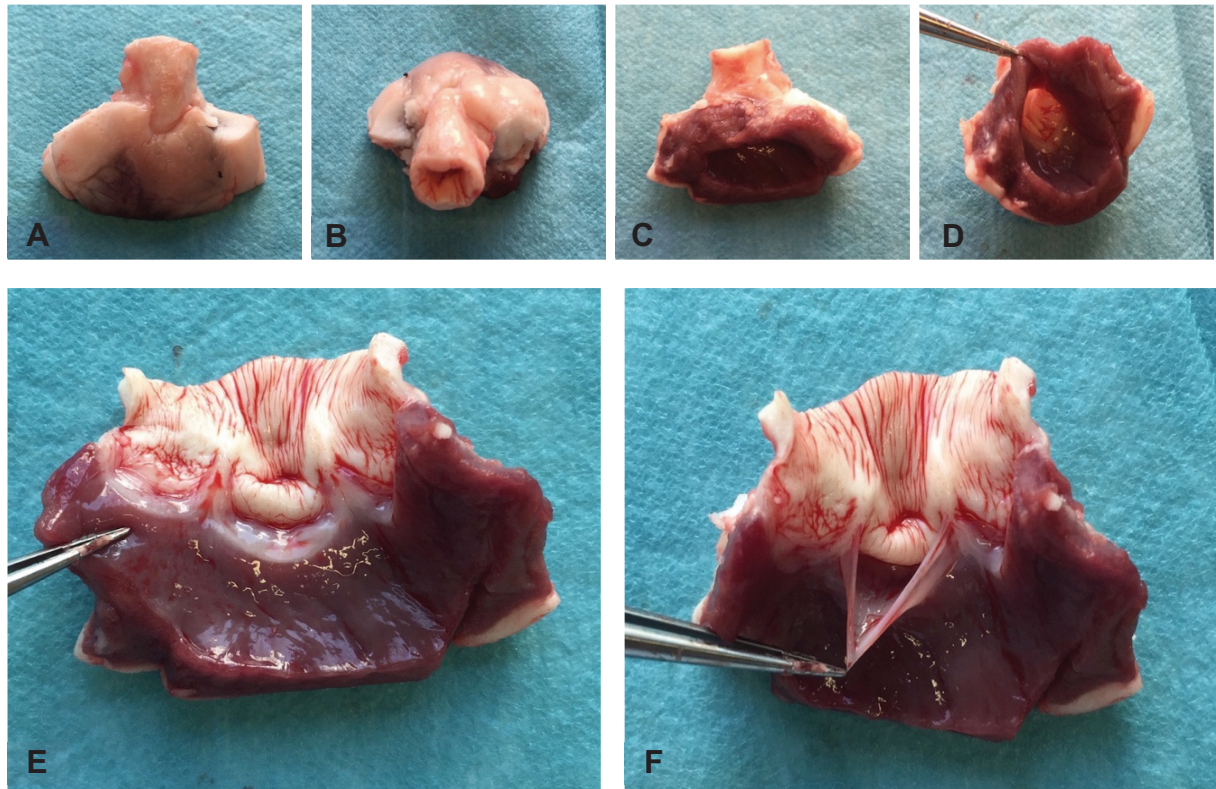


Abb. 5: Native, ovine Pulmonalklappe nach Präparation

Verschiedene Ansichten der zuvor präparierten ovinen Pulmonalklappe *in toto* und nach Durchtrennung der Klappe mit Sicht auf die einzelnen Klappensegel vor der Dezellularisierung.

(A) Ansicht ventral; (B) Ansicht cranial; (C) Ansicht dorsal; (D) Ansicht caudal; (E) Pulmonalklappe durch Längsschnitt eröffnet; (F) intakte Pulmonalklappensegel.

3.2 Detergensbasierte Gewebedezellularisierung

3.2.1 Lösungen zur Dezellularisierung von kardialen Gewebe

Zur chemischen Dezellularisierung von Geweben im Bereich des *Tissue Engineering* werden Tenside sowie Säuren verwendet. Diese sind zum Teil auch in haushaltsüblichen Reinigungsmitteln zu finden. Detergenzien, die in unterschiedlichen Konzentrationen und Protokollen für diese Arbeit genutzt wurden, werden im Folgenden mit ihren spezifischen Eigenschaften erläutert.

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

Auch bekannt als Natriumdodecylsulfat ist chemisch ein Monoester der Schwefelsäure und Laurylalkohol, das Hauptanwendungsgebiet besteht als anionisches Tensid in Reinigungsmitteln. In höheren Konzentrationen wird es genutzt, um Proteine und Protein-Protein-Verbindungen zu denaturieren. Unerwünschte Effekte der Anwendung sind die Zersetzung der ECM-Strukturen. Als hauptsächlicher Nachteil des SDS werden die Strukturveränderung des Kollagens und eine verminderte Konzentration von GAG innerhalb der ECM beschrieben. [30][69][70]

Desoxycholsäure (DCA)

DCA ist eine sekundäre Gallensäure, die im menschlichen Körper eine wichtige Funktion innerhalb der Fettverdauung hat. Die Anwendung als Detergens, insbesondere als Natriumdesoxycholsäure, während der Dezellularisierung basiert wie bei SDS auf der Wirkung als anionisches Tensid. DCA wird im Vergleich zu SDS ein größerer negativer Effekt auf die Strukturbeschaffenheit der EZM zugeschrieben. In geeigneter Konzentration und in Kombination mit SDS wird es aufgrund seiner starken Dezellularisierungseigenschaften erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe eingesetzt. [30]

Natriumazid (NaN_3)

Natriumazid gehört zur Stoffklasse der Azide und ist das Natriumsalz der Stickstoffwasserstoffsäure. In biologischen und biotechnologischen Anwendungen wird Natriumazid eingesetzt, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern. Die beste antibakterielle Wirkung hat es dabei im gram-negativen Bereich, jedoch auch einige sporenbildenden gram-positiven Bakterien sind sensibel. Es ist sehr giftig (letale Dosis für Menschen > 700 mg) und bewirkt eventuell eine Störung der Atmungskette auf zellulärer Ebene, der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht hinreichend erklärbar. [71][72][73]

Triton-X-100

Triton-X-100 auch bekannt als Octoxinol-9 ist ein Octylphenoethoxylat und ein nichtionisches Tensid, welches Lipid-Lipid-Verbindungen und Lipid-Protein-Verbindungen aufbricht. Protein-Protein-Verbindungen werden jedoch nicht angegriffen, was Triton-X-100 zu einem relativ milden Detergens macht. Da EZM-Proteine von Triton-X-100 weitestgehend in ihrer ursprünglichen und funktionellen Form belassen werden. Die Ergebnisse bei einer alleinigen Behandlung mit diesem Tensid zeigen in verschiedenen Studien unterschiedliche Dezellularisierungsgrade abhängig vom verwendeten Gewebe, sodass unsere Arbeitsgruppe Triton-X-100 zusammen mit anderen Detergenzien einsetzt. [30][67][35]

PBS + Pen-Strep

Phosphatgepufferte Salzlösung (engl: *Phosphat Buffered Saline*) ist eine Pufferlösung, die es ermöglicht, eine für Zellen nichtschädliche Umgebung zu schaffen. Diese wird durch einen pH-Wert von ca. 7,4 und einem physiologischen Gehalt an Salzen, welcher den osmotischen Druck des menschlichen Organismus herstellt, erreicht. In diesem Versuchsaufbau dient der stabile pH-Wert dem Schutz des verwendeten biologischen Materials und seiner Struktur. Um eine

möglichst geringe Belastung mit bakteriellen Mikroorganismen in der Perfusionslösung zu gewährleisten, wird PBS in diesem Protokoll in Kombination mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin verwendet. Penicillin wirkt dabei vor allem im grampositiven Bereich und Streptomycin deckt als Aminoglykosid hauptsächlich den gram-negativen, aber auch den gram-positiven Bereich der Bakterien ab.

3.2.2 Perfusionsbasierte *in toto* Herzdezellularisierung

Um eine optimale Auswaschung jeglichen zellulären Materials zu erreichen, wurde ein spezielles, bereits etabliertes Langzeitperfusionssystem genutzt. [38][67] Die Lösungen wurden bei retrogradem Fluss über die Aorta mittels koronarer Perfusion in das Herzgewebe eingebracht. Im Kleintiermodell wurden dafür die frisch entnommenen und heparinisierten Herzen in das Langzeitperfusionssystem mittels Luer-Lock-Verbindung eingeschraubt und in das sterilisierte System integriert. Durch das automatische Dezellularisierungssystem war es möglich, die koronare Langzeitperfusion unter reproduzierbaren Bedingungen für bis zu 8 Herzen gleichzeitig durchzuführen. [74] Die verwendeten ovinen Herzen wurden jeweils einzeln in einer Perfusionsanlage dezellularisiert. [68] Das Hauptaugenmerk lag dabei in der Etablierung und Evaluation einer Großherzdezellularisierung, anhand der bereits im Rattenmodell gewonnenen Erfahrung mit *in toto* dezellularisierten Herzen.

Für die Rattenherzdezellularisierung wurden unmittelbar nach der Entnahme und Präparation der Herzen diese unter sterilen Bedingungen und Vermeidung von Bläschenbildung in den Kreislauf des automatisierten Langzeitperfusionssystems eingespannt. Das gesamte System ist vollständig autoklavierbar und lässt sich steril über einen 3-Wege-Hahn befüllen. Zur Befüllung der Perfusionskammer mit Dezellularisierungsflüssigkeit wurde eine 2-Liter Vorratsflasche (Schott Duran) mit einem sterilisierten Schlauchsystem genutzt. Das Perfusionsgefäß wurde bis zur vollständigen Bedeckung des Organs mit ca. 120 ml Lösung befüllt. Zur Inbetriebnahme wurde die Kammer wieder verschlossen und der in das System integrierte Drucksensor hinzugeschaltet. Dadurch ist das System in der Lage, den softwaregesteuerten Automatikmodus auszuführen und selbstständig den eingestellten Perfusionsdruck über die Flussgeschwindigkeit aufrechtzuerhalten. Der gewählte Perfusionsdruck von 77,5 mmHg konnte so bis zur endgültigen Dezellularisierung gleichbleibend reguliert und mittels Aufzeichnung überwacht werden.

Für die Großherzdezellularisierung wurden die ovinen Herzen mit einer dauerhaften direkten Kannülierung der Koronarostien mittels Silikonkoronarostienkatheter (Medtronic, Minneapolis, MN, USA) bestückt und im Anschluss auf Gefäßleckagen überprüft. Bei Bedarf wurden

kleinere äußere Gefäßleckagen durch chirurgische Titan-Clips verschlossen. Das Herz wurde daraufhin mittels chirurgischem Nahtmaterial in einem Perfusatgefäß hängend positioniert.

Das Großherzmodell wurde ebenfalls softwaregesteuert und druckkontrolliert mit 100 mmHg durch das Langzeitperfusionssystem basierend auf SDS und DCA Detergens dezellularisiert. Im Anschluss an die Detergenzienlösungen erfolgten ein doppelter Spülungsschritt durch destilliertes Wasser und im Anschluss PBS Lösung. Das Perfusat spülte dabei über die Kannülierung direkt in die Koronarostien und konnte nach Passage des Koronarsystems passiv in das Perfusatgefäß abtropfen. Von dort wurde es erneut durch ein Schlauchsystem mittels Rollerpumpe in den Kreislauf eingespeist. Dabei enthält das Großtiermodell einige nicht außer Acht zu lassende Unterschiede zum Kleintiermodell, wie z.B. in der logistischen Bewältigung der Mengen an benötigtem Perfusat. Dabei rangierten je nach Protokoll die Mengen zwischen 5 und 20 L Lösung, welche in einmaligem Systemdurchfluss benutzt wurde oder in Rückführung mehrmals das Herzsystem passierte.

3.2.3 Diffusionsbasierte Gewebedezellularisierung

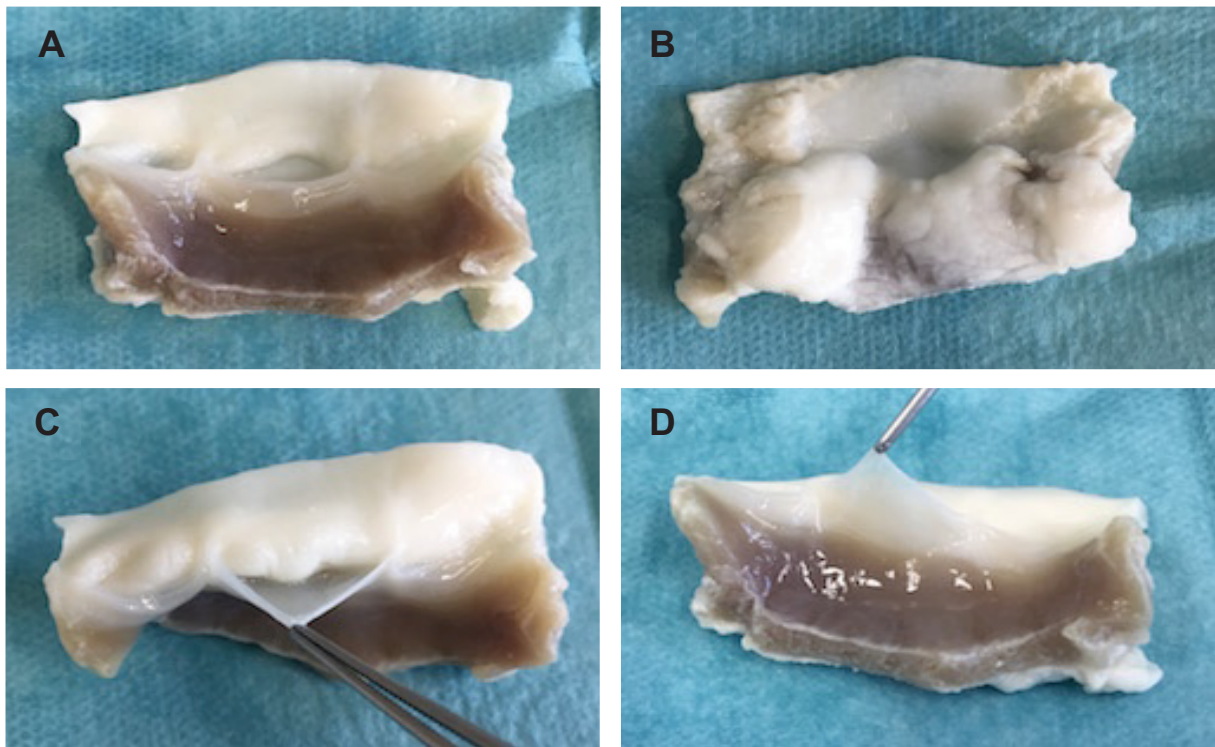


Abb. 6: Verschiedene Ansichten der eröffneten Pulmonalklappe nach der diffusionsbasierten Dezellularisierung mit Darstellung der Klappensegel
(A) Ansicht von luminal; (B) Außenansicht; (C) intakte Pulmonalsegel, Ansicht von kranial; (D) Ansicht von kaudal.

Sofort nach Präparation der ovinen Pulmonalklappen wurden diese gemeinsam in einem mit Betaisodona gefüllten 2 L-Becherglas für 1 h desinfiziert. Anschließend wurde jede extrahierte Pulmonalklappe einzeln in eine 250 ml Glasflasche überführt und mit 150 ml PBS/*Pen-Strep* aufgefüllt. Die Pulmonalklappe wurde vollständig mit Lösung bedeckt und die Flasche daraufhin verschlossen und für eine Stunde auf einen Schüttler bei 220/min abgestellt. Im nächsten Schritt wurden Pulmonalklappen unter der *Laminar Flow Bench* in die nächste Glasflasche befüllt mit 0,5 % SDS, 0,5 % DCA- und 0,05 % NaN_3 -Lösung überführt. Die Detergenzien wirkten ab diesem Zeitpunkt für insgesamt 48 h auf die Zellstruktur der Klappen ein. Ein Wechsel mit frischer Detergenzienlösung fand alle 12 h unter sterilen Bedingungen statt. Von Wechsel zu Wechsel der Lösung ließ sich in diesem Stadium eine kontinuierliche Entfärbung des Präparates beobachten, welche eine kontinuierliche Dezellularisierung anzeigte. Das finale Dezellularisierungsergebnis zeigt **Abb. 6**. Nach insgesamt 48 h fand ein erneuter Wechsel der Klappen in mit 0,05 % NaN_3 befüllte Glasflaschen statt. Die Klappen verblieben weitere 24 h in der NaN_3 -Lösung zur abschließenden biologischen Desinfektion. Anschließend wurden die Klappen dreimal für jeweils 48 h mit 150 ml PBS/*Pen-Strep* (1 %) gespült. Bis zur Verwendung der ovinen dezellulisierten Pulmonalklappen“ wurden diese in PBS/*Pen-Strep* (1 %) in 50 ml *Falcon Tubes* bei 4 °C gelagert.

3.2.4 Protokolle für die *in toto* Dezellularisierung von Herzen

Die verwendeten Protokolle setzen sich aus einer Reihe von theoretischen Überlegungen, Literaturrecherche sowie der in zahlreichen Gewebedezellularisierungsversuchen bereits gewonnenen Erfahrungen der Arbeitsgruppe zusammen. Dabei sind alle Protokolle detergenzien-basierte Dezellularisierungsmethoden, die für den jeweiligen Zweck angepasst wurden. [24][30][2][6]

Dezellularisierungsprotokoll Rattenherzen

Das verwendete Protokoll konnte zuvor bereits innerhalb der Arbeitsgruppe etabliert und zur Perfusionsdezellularisierung erfolgreich eingesetzt werden. Hierunter konnte im Rahmen vorheriger Arbeiten ein kontinuierliches, sehr gutes Dezellularisierungsergebnis durch wiederholte histologische Untersuchungen sichergestellt werden. Im Verlauf und zunehmender Erfahrung erfolgten kleinere Modifikationen der Detergenzien-Einwirkungszeiten, die in der aktuellen Version zu einer gleichbleibenden Qualität bei kürzerer Perfusionsdauer führten.

Schritt	Zeit	Lösung
1.	30 min	PBS+Heparin
2.	12 h	SDS+DCA+NaN ₃
3.	15 min	H ₂ O
4.	15 min	H ₂ O
5.	15 min	H ₂ O
6.	30 min	Triton X 100
7.	12 h	PBS + <i>Pen-Strep</i>
8.	12 h	PBS + <i>Pen-Strep</i>
9.	12 h	PBS + <i>Pen-Strep</i>
10.	24 h	PBS + <i>Pen-Strep</i>
Herzentnahme		

Tabelle 1: Dezellularisierungsprotokoll Rattenherz

Zeitliche Abfolge, Dauer und Zusammensetzung der Perfusionslösung

Dezellularisierungsprotokoll ovine Herzen

Das Schafsherz wurde über eine direkte Kanülierung der Koronarostien mit Perfusionslösung durchspült. Dabei wurden je 10 L Detergenzienlösung (0,5 % SDS + 0,5 % DCA) angesetzt und durchspülten das Herz in einem kontinuierlichen Kreislauf für 2 h. Daraufhin schloss sich ein 30-minütiger Spülschritt mit H₂O an. Dieser erfolgte in einmaligem Durchfluss durch das Herz und wurde daraufhin abgepumpt. Das Volumen wurde insgesamt großzügig gewählt, um eine Aufsättigung der Perfusionslösung mit Biomasse und dadurch eine potenziell verminderte Dezellularisierungsleistung zu verhindern. Der gewählte Perfusionsdruck entsprach 100 mmHg und wurde kontinuierlich durch das Softwaresystem überwacht und aufgezeichnet. [68]

Perfusionsart	Druck (mmHg)	Detergens	Protokoll
Koronare Perfusion	100	0,5 % SDS + 0,5 % DCA; H ₂ O	24 h (10 L/2 h + 30 min H ₂ O in Rkf.)
Lagerung in PBS + <i>Pen-Strep</i> (1 %)			

Tabelle 2: Dezellularisierungsprotokoll der perfusionsbasierten *in toto* Dezellularisierung von ovinen Herzen

Zeitliche Abfolge, Dauer und Zusammensetzung der Perfusionslösung

Dezellularisierungsprotokoll ovine Pulmonalklappen

Schritt	Zeit	Lösung
1.	1 h	Betasisadona
2.	1 h	PBS + <i>Pen-Strep</i> 2 %
3.	12 h	SDS 0.5 %, DCA 0.5 %, NaN₃ 0.05 % (1)
4.	12 h	SDS 0.5 %, DCA 0.5 %, NaN₃ 0.05 % (2)
5.	12 h	SDS 0.5 %, DCA 0.5 %, NaN₃ 0.05 % (3)
6.	12 h	SDS 0.5 %, DCA 0.5 %, NaN₃ 0.05 % (4)
7.	24 h	Wasser + NaN₃ 0.05 %
8.	48 h	PBS + <i>Pen-Strep</i> 1 % (1)
9.	48 h	PBS + <i>Pen-Strep</i> 1 % (2)
10.	48 h	PBS + <i>Pen-Strep</i> 1 % (3)
Lagerung bei PBS + <i>Pen-Strep</i> (1 %)		

Tabelle 3: Dezellularisierungsprotokoll der diffusionsbasierten Dezellularisierung oviner Pulmonalklappen
Zeitliche Abfolge, Dauer und Zusammensetzung der Dezellularisierungs- und Spüllösung

Nach Ende des Perfusionsprotokolls und erfolgreicher Dezellularisierung der Pulmonalklappen wurden die Dezellularisierungsgefäße unter sterilen Bedingungen geöffnet und die Herzklappen entnommen. Diese wurden anschließend bis zur Weiterverwendung in mit PBS + *Pen-Strep* (1 %) gefüllten 50 ml *Falcon Tubes* bei 4 °C gelagert.

3.3 Zellkultur

Die gesamten Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders beschrieben unter einer *Laminar-Airflow*-Werkbank durchgeführt. Folgende Inkubationsparameter des Brutschranks wurden dabei benutzt:

Luftfeuchtigkeit 100 %; CO₂ 5 %; Temperatur 37 °C. Verwendet wurden, mit 1 % Gelatine beschichtete 225 cm³ Zellkulturflaschen. Als Nährmedium der Zellen diente spezielles Endothelzellmedium der Firma Promo Cell (Heidelberg), im Folgenden als Zellmedium, Endothelmedium oder Medium bezeichnet.

Kultur von Human Umbilical Vein Cells (*HUVECs*)

Die verwendeten Zellen wurden freundlicherweise vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Gewonnen werden *HUVECs* aus dem Endothel menschlicher Nabelschnurvenen, nachdem die kindliche Nabelschnur in üblicher Weise bei der Geburt reseziert wurde. Durch die geringen Kosten und günstigen Kulturbedingungen eignen sich *HUVECs* bestens als Standardmodell funktioneller endothelialer Forschung.

Bestandteil	Konzentration
<i>Fetal Calf Serum</i>	0,02 ml/ml
<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>	0,004 ml/ml
<i>Epidermal Growth Factor (Recombinant Human)</i>	0,1 ng/ml
<i>Basic Fibroblast Growth Factor (Recombinant Human)</i>	1 ng/ml
Heparin	90 µg/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	2 %
Amphotericin	1 %

Tabelle 4: Zusammensetzung und Bestandteile des verwendeten Endothelzellmediums

Die *HUVECs* wurden in undifferenziertem Zustand (Passage 3-4) aufgetaut und zusammen mit 25 ml des Endothelzellmediums im Brutschrank inkubiert. Durch tägliche Kontrolle wurde der optimale Zeitpunkt zum Splitten der Zellen bestimmt und bei ca. 70 % Konfluenz gewählt. Dabei wurden die *HUVECs* je nach Bedarf und erwünschter Passage (in der Regel bis maximal Passage 8) im Verhältnis 1:3 bzw. 1:2 in neue Kulturflaschen überführt. Für das Splitten der Zellen wurde die Kulturflasche zunächst mit erwärmtem PBS gewaschen und die Zellen anschließend durch Trypsin-EDTA (Trypsin 0,05 % in 0,53 mM EDTA) unter Mikroskop Kontrolle von der Kulturflasche abgelöst. [76][77]

3.4 Funktionelle Vaskularisierung dezellularisierter kardialer EZM

Die selektive Rebesiedlung von dezellularisierter myokardialer EZM der Ratte erfolgte mit *HUVECs*. Die Funktionalität des Endothels wurde anschließend durch einen *TNF-α*-Stimulationstest und immunhistologische Untersuchungen evaluiert.

3.4.1 Zellbesiedlung der Rattenherzen

Zur Vorbereitung der koronaren Wiederbesiedlung mit *HUVECs* wurden die dezellularisierten Rattenherzen über Nacht in *High Glucose DMEM*-Medium inkubiert. Dies geschah zum Ausschluss eventueller mikrobieller Verunreinigungen. Sichtbar wird eine bakterielle Kontamination durch den Verbrauch des Nährstoffgehalts des Mediums. Das oftmals rasante Wachstum bakterieller Organismen bewirkt hierdurch einen pH-Wert getriggerten Farbumschlag des Mediums und macht die Kontamination indirekt sichtbar. Eine direkte mikroskopische Kontrolle wurde ebenfalls eingesetzt, um Kontaminationen zu detektieren. Um eine möglichst sterile Umgebung innerhalb der Laminar-Flow-Werkbank herzustellen wurde der Arbeitsbereich durch sterile Abdecktücher unterteilt. Die sterile Unterlage diente dabei als Besiedlungsbereich, der restliche Platz innerhalb der Arbeitsbank wurde für die Arbeitsschritte, welche die Zellkultur betrafen, genutzt. Alle Arbeiten im sterilen Gebiet wurden mit sterilen Handschuhen ausgeführt, um mikrobielle Kontaminationen im weiteren Verlauf zu verhindern. Dabei wurden die zur Füllung benutzten Spritzen am Herzen belassen und verhinderten so das Eindringen von Luft in das Koronarsystem. (**Abb. 7b**) Um die Zellen für die endotheliale Wiederbesiedlung zu ernten, wurden die Zellkulturflaschen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin + EDTA (Trypsin 0.05 % in 0.53 mM EDTA) vom Kulturflaschenboden abgelöst und mittels Zentrifuge (1500 rpm/5 min) pelletiert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde das Pellet in 4 ml warmen Medium resuspendiert und mit einer Neubauerzählkammer mittels Trypanblaufärbung ausgezählt. Für jedes Herz, welches zur Wiederbesiedlung vorgesehen war, wurden $4,5-5 \times 10^6$ Zellen, mit einer Konzentration im Medium von 1×10^6 Zellen pro ml verwendet. Nach mehrmaligem Resuspendieren der frischen Zellsuspension wurde diese zur Injektion aufgezo- gen und unter Vermeidung von Luftblasen mit der Kanüle am Herzen konnektiert. Die Zellbesiedlung erfolgte anschließend per Injektion retrograd über die Aorta und nutzte die natürliche Funktion der intakten Aortenklappen, um eine gezielte Koronarperfusion mit der Zellsuspension zu erreichen. Die eigentliche Perfusion wurde manuell mit geringem Druck gesteuert, dabei wurde angestrebt, einen möglichst langsamen Fluss im Koronarsystem beizubehalten, um die Adhäsion der Zellen zu fördern und ein möglichst gleichmäßiges Besiedlungsmuster herzustellen (**Abb. 7c**).

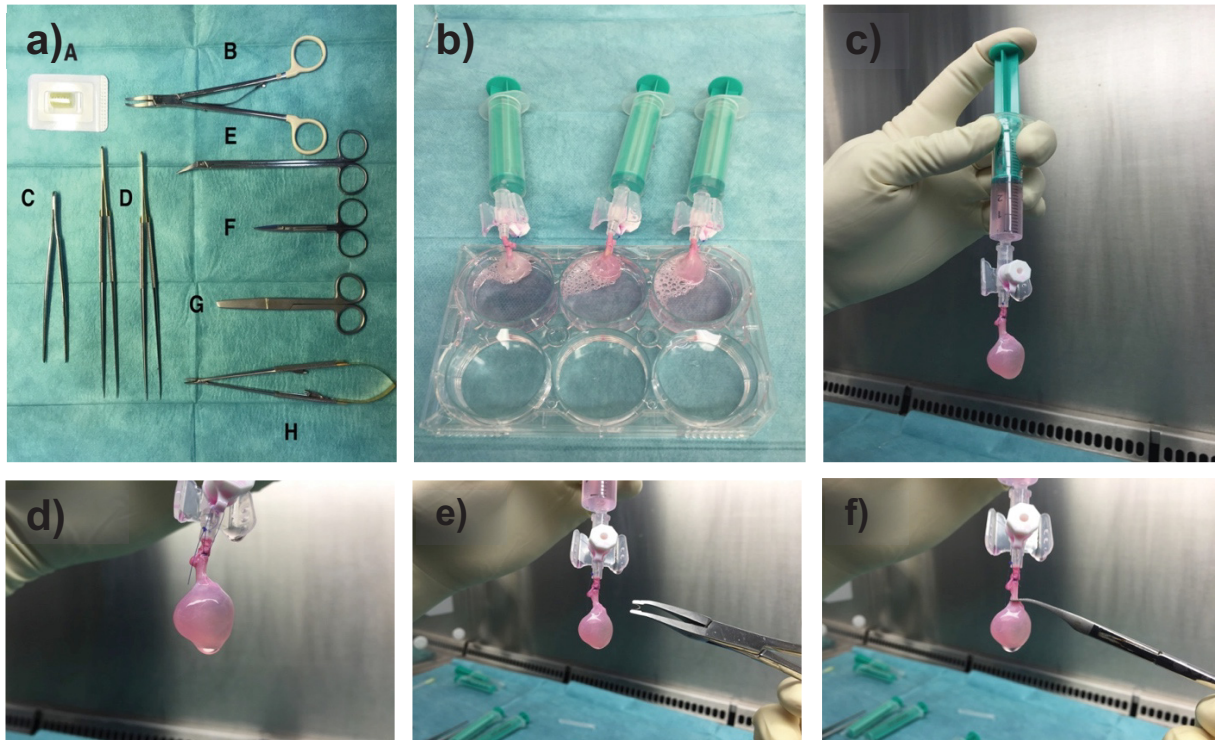


Abb. 7: Re-endotheliale Wiederbesiedlung von *dECM*-Rattenherzen

- a) Übersicht des chirurgischen Bestecks (A) Titanclips; (B) Clipapplikator; (C) anatomische Pinzette; (D) 2 mikrochirurgische Pinzetten; (E) Gefäßschere 30°; (F) feine Schere; (G) große Schere; (H) mikrochirurgischer Nadelhalter.
- b) Dezellularisierte Herzen werden mit Endothelmedium vorkonditioniert; c) langsame retrograde aortale Zellperfusion mittels einer 5 ml Spritze; d) gut perfundiertes, balloniertes Herzgerüst nach erfolgreicher Perfusion; e) Vorbereitung zur Clipapplikation; f) aortaler Verschluss durch Titan-Clip, um ein Herausfluss der Zellsuspension zu vermeiden.

Die Besiedlung wurde beendet, indem manuell mit der Spritze leichter Druck aufgebaut und die Aorta mittels Titan-Clips verschlossen wurde, sodass das Koronarsystem mit der Zellsuspension gefüllt blieb (**Abb. 7d-e**) (**Abb. 7f**). Die übrige Aorta samt eingebrachter Kanüle wurde dann mit einer chirurgischen Schere distal des Clips abgetrennt und entsorgt. Abschließend wurde das Herz mit weiterem Medium von außen gespült, um etwaige von außerhalb anhaftende Zellen abzuwaschen und danach in ein 6-Well abgelegt. Das Herz wurde mit 10 ml frischem Medium bedeckt und im Brutschrank weiter inkubiert. Nach diesem Verfahren wurde nacheinander jedes Herz koronar mit ca. $4,5 - 5 \times 10^6$ *HUVECs* besiedelt. Ein zügiges und fehlerfreies Arbeiten war dabei von immenser Bedeutung um den Aufenthalt in schädlicher, nährstoffarmer Umgebung und die unphysiologische Temperaturdifferenz für menschliche Zellen zeitlich so gering wie möglich zu halten.

3.4.2 Präparation des *Tissue Flap*

Die Präparation des „*Coronary Artery Tissue Flap Model*“ (**Abb. 8**) war bereits eine von der Arbeitsgruppe Aubin et al. etablierte Methode und wurde dementsprechend anhand der etablierten Protokolle durchgeführt. [38]

Unter sterilen Bedingungen der Zellkulturarbeitsbank wurden die am Tag zuvor koronar mit *HUVECs* besiedelten Herzen, einzeln aus dem umgebenden Medium entfernt, um die weitergehende Präparation zum *Tissue Flap* durchzuführen.

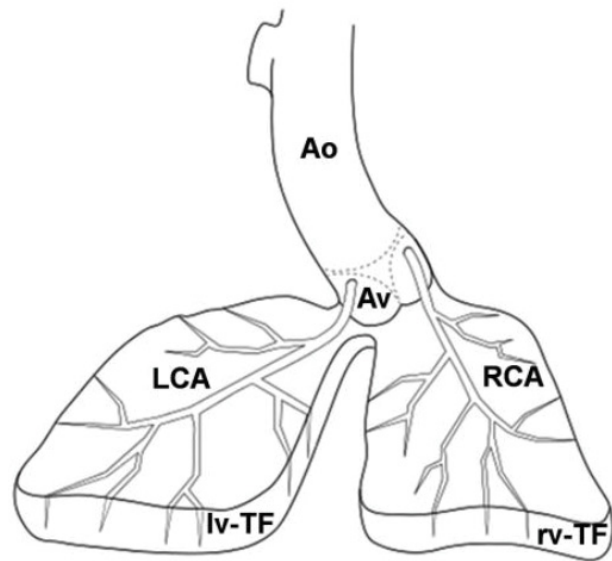


Abb. 8: Skizze des „*Coronary Artery Tissue Flap Model*“ aus „A novel native derived artery tissue flap model“ Aubin et al. (2013)

Im ersten Schritt wurde nach kurzer anatomischer Orientierung der Apex des dezellularisierten Rattenherzen mit einer Schere entfernt und in einem mit Nährmedium gefüllten 50 ml *Falcon Tubes* für die weitere Analytik kurzzeitig verwahrt. Mittels feiner mikrochirurgischer Pinzette wurde nun der linke und rechte Ventrikel der filigranen extrazellulären Matrix zur Orientierung sondiert. Durch mehrere Schnitte wurde das Herzseptum entfernt, sodass, wie anhand **Abb. 9 e-f** erkennbar ist, der rechte und linke Ventrikel voneinander getrennt wurden. Durch das Heraustrennen des Septums hatten nun der rechte Ventrikel und der linke Ventrikel eine nahezu quadratische Struktur und waren nur noch über die rechte und die linke Koronararterie mit der Aorta verbunden. Das durch die Präparation so entstandene „*Coronary Artery Tissue Flap Model*“ ermöglichte eine selektive Perfusion des linken und rechten Ventrikels über die entsprechende Koronararterie. Um eine weitere Kultivierung der Zellen innerhalb der *Tissue Flaps* zu ermöglichen, wurden die *Tissue Flaps* an der Aorta in 6-Well-Kammern aufgehängt, sodass die *Tissue Flaps* frei im Medium schweben konnten. Pro Well und *Tissue Flap* wurde ca. 12 ml vorgewärmtes Endothelzellmedium eingefüllt und die Länge der Aufhängung so angepasst, dass das Organ frei schwebte und von allen Seiten gleichermaßen von Medium umspült wurde. Die aus dezellularisierten Rattenherzen hergestellten *Tissue Flaps* wurden nach der Präparation wieder im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur weiteren Nutzung inkubiert. Die weitere Inkubation betrug bei Verwendung zur molekulargenetischen Auswertung einen Tag und für die Verwendung als histologisches Präparat fünf Tage. [38]

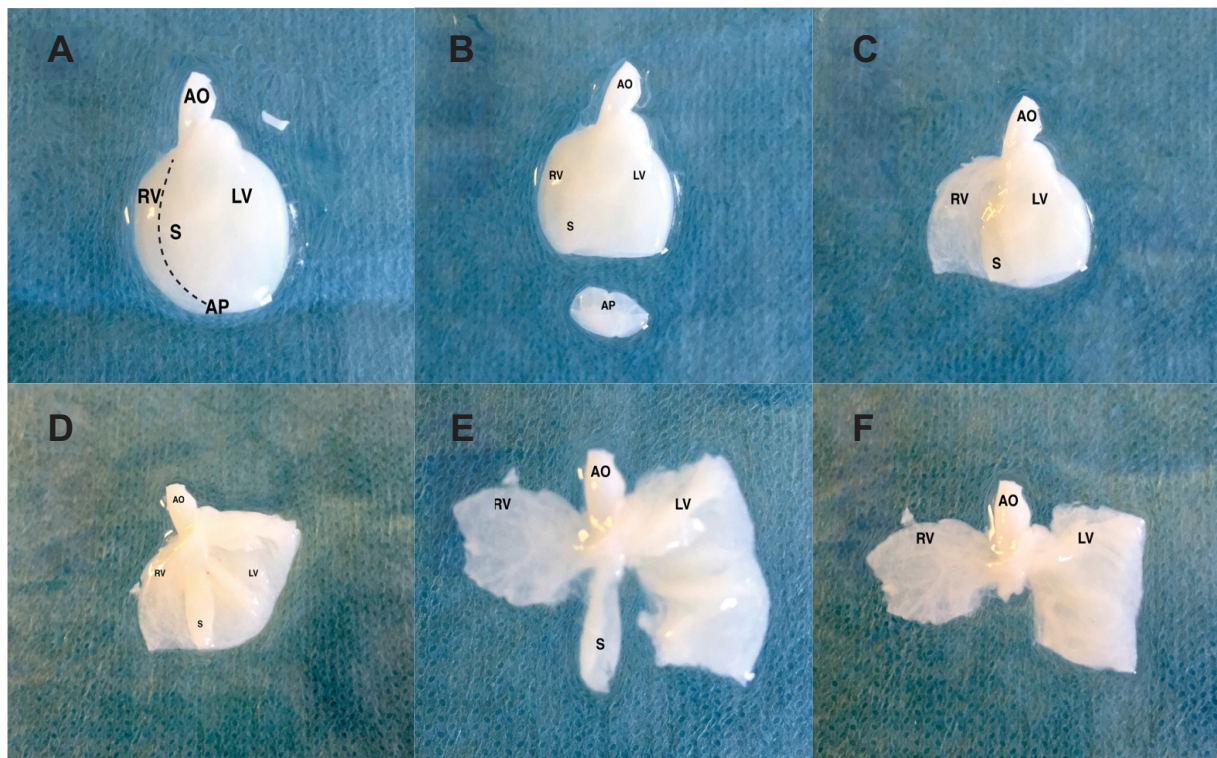


Abb. 9: AO (Aorta), LV (Linker Ventrikel), RV (Rechter Ventrikel), AP (Apex), S (Septum); (A) dezellularisiertes Rattenherz mit beschrifteten anatomischen Strukturen (B) abgetrennter Apex; (C) Nach ventraler Inzision der Wand des RV, RV aufgeklappt; (D) nach Inzision der Wand des LV, LV aufgeklappt, Septum sichtbar; (E) erneute Inzisionen bds. des Septums; (F) fertiger Flap, nach Abtrennen des Septums, RV und LV aufgeklappt sichtbar.

3.4.3 Mikroskopische Kontrolle der Besiedlung

Um eine erfolgreiche Wiederbesiedlung mit HUVEC nachzuweisen, erfolgte im direkten Anschluss an die Präparation des *Tissue Flaps* eine mikroskopische Begutachtung (DM 2000 Durchlichtmikroskop, Leica Microsystems, Wetzlar). Die zuvor entfernten Apex- und des Septumanteile des Herzens wurden hierbei mit Calceinfarbstoff in PBS für 15-30 min gefärbt und anschließend mikroskopisch untersucht. Da es sich um eine Lebendfärbung handelt, wurde der Farbstoff in das Cytoplasma der Zellen aufgenommen und von vitalen Zellen in die fluoreszierende Form umgewandelt. Eine erfolgreiche Besiedlung der Koronargefäße des Apex und Septums mit vitalen Zellen konnte somit durch Fluoreszenz nachgewiesen werden.

3.4.4 *TNF- α* -Stimulation der HUVECs

Tumor Nekrose Factor-alpha, ein Zytokin, das auf eine Vielzahl von Zellaktivitäten Einfluss ausübt, wurde aufgrund der zahlreichen, für das Endothel wirksamen Eigenschaften ausgewählt um anhand der Wirkung auf die endotheliale Genexpression die Funktion der koronar wieder-

besiedelten *HUVECs* zu evaluieren. Dafür wurden entsprechende für die Endothelfunktion spezifische Zielgene ausgewählt und die Genexpression nach der Anregung durch *TNF- α* mittels *Real-Time-PCR*-Methode untersucht.

Dafür wurde ein zweizeitiges Vorgehen gewählt und zunächst eine *TNF- α* -Stimulation der *HUVECs* unter reinen Zellkulturbedingungen durchgeführt. In einem weiteren Versuch erfolgte die *TNF- α* -Stimulation der Zellen nach der koronaren Wiederbesiedlung im Rattenmodell. [78] [79]

3.4.4.1 Stimulation der *HUVECs* in Zellkultur

Für die Stimulationsgruppe wurde das verwendete Endothelzellmedium mit einer Konzentration von 10 ng *TNF- α* /ml Medium angereichert und ca. 10^6 Zellen gleichmäßig auf ein 6-Well verteilt. Bei einer angestrebten Zellzahl von 180 000 Zellen (90000 Zellen/ml) ergab sich ein gleichmäßiger das 6-Well ausfüllender Zellrasen. Diese wurden für 6 h bei den üblichen Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde ebenfalls für 6 h inkubiert, jedoch ohne den Zusatz des Zytokins. Nach Ablauf der 6 h Inkubation wurden sowohl die stimulierten, als auch die nicht-stimulierten Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA (Trypsin 0.05 % in 0.53 mM EDTA) abgelöst und in üblicher Methode in Einfriermedium, unmittelbar und einzeln in speziellen Cryovials mit Stickstoff cryokonserviert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.4.2 Stimulation der *HUVECs* im *Tissue Flap*-Modell

Die Besiedlung der *Tissue Flaps* erfolgte hierbei wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben mit ca. 10^6 *HUVECs*. Für die Stimulationsgruppe im *Tissue Flap*-Modell wurde das verwendete Endothelzellmedium mit einer Konzentration von 10 ng *TNF- α* /ml Medium angereichert und die *Tissue Flaps* in 6-Wells für 6 h bei den üblichen Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde ebenfalls für 6 h inkubiert, jedoch ohne den Zusatz des Zytokins. Nach Ablauf der 6 h Inkubation wurden sowohl die stimulierten als auch die nicht-stimulierten Präparate unmittelbar und einzeln in speziellen *Cryovials* mit Stickstoff cryokonserviert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.5 Molekulargenetische Auswertung

3.4.5.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolierung des *Tissue-Flap*-Modells wurde das *RNEasy Kit* von Qiagen (Qiagen, Hilden) genutzt. Die Prozedur erfolgte unter Berücksichtigung der Herstellerangaben. Um die molekulargenetische Auswertung des *Tissue-Flap*-Modells durchzuführen, wurde der cryokon-servierte *Flap* mit 600 µl RLT-Puffer benetzt und der Inhalt gemörsert. Durch mehrfaches Mörsern des *Flaps* soll sichergestellt werden, dass möglichst viele zelluläre Bestandteile von der Matrix gelöst werden und in die Flüssigkeit zur Extraktion übergehen. Danach wurde strikt nach Protokoll des *RNEasy Kit* vorgegangen. Nach erfolgreicher RNA-Gewinnung wurde so 30 µl RNA-haltiges Eluat zur weiteren Analyse gewonnen, welches bei -80 °C gelagert wurde. [80]

3.4.5.2 Quantität und Qualität der RNA

Die aus den koronar re-besiedelten *Tissue Flaps* gewonnene RNA wurde zunächst durch eine *NanoDrop*-Messung (*NanoDrop* 1000, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) hinsichtlich RNA Konzentration und ribosomalen Quotienten orientierend untersucht. Anschließend wurde ein *NanoChip*-Test (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent, St. Clara, CA, USA) durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt und in Bezug auf Reinheit und Konzentration ausgewertet. Die Auswertung beinhaltete RNA-Konzentration, RNA-Gesamtgehalt und durch die Zusammenfassung mehrerer RNA-Charakteristika wurde ein sogenannter RIN-Wert (*RNA Integrity Number*) ermittelt. Der RIN-Wert ermöglichte die objektive Vergleichbarkeit verschiedener RNA-Proben bezüglich der RNA-Qualität. [81]

3.4.5.3 Umschreibung cDNA

Die Umschreibung der RNA in cDNA für die *Real-Time PCR* wurde mit dem QuantiTect® *Reverse Transcription Kit* von Qiagen durchgeführt. Sämtliche Schritte erfolgten streng nach Herstellerprotokoll. Die benötigten Reagenzien wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und danach während des Umschreibevorgangs auf Eis gelagert. Die einzelnen Umschreibungsschritte, mit den für den Reaktionsprozess benötigten Temperaturen und Reaktionszeiten, wurden mithilfe eines *Biometra T3000 Thermocyclers* (Biometra, Göttingen) nach vollautomatischem Programm durchgeführt und entsprechen dem Herstellerprotokoll.

3.4.5.4 Real-Time qPCR

Reagenz	Menge
Cyanin-Farbstoff BRYT Green™	10 µl
H ₂ O	7,4 µl
cDNA	2 µl
Primer (5' zu 3')	0,3 µl
Primer (3' zu 5')	0,3 µl

Tabelle 5: Verwendeter Probenansatz und Zusammensetzung zur Real-Time qPCR

Bei dem zur Durchführung der Amplifikation und Signaldetektion benötigten *Thermocycler* handelt es sich um ein *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* von Applied Biosystems (Life Technologies, Darmstadt), welches zusammen mit dem *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, Mannheim) für die Versuche verwendet wurde. Den Inhalt des Probenansatzes zeigt Tabelle 5.

Die Erstellung des generierten Datensatz erfolgte unter Berücksichtigung der *MIQE-Guidelines* und die Auswertung anhand der Livak-Methode ($\Delta\Delta C_t$ -Methode) [82] [83]

Folgende Zielgene wurden anhand der spezifischen Expression in endothelialen Zellen ausgewählt und ausgewertet:

3.4.5.5 Antiinflammatorische Gene

ICAM-1

Als Protein wird ICAM-1 in menschlichen Endothelzellen sowie Leukozyten als Transmembranprotein dauerhaft, ausgehend vom ICAM-1-Gen, produziert. Als Hauptaufgabe von ICAM-1 gilt vornehmlich die Stabilisierung von Zell-Zell-Verbindungen, als auch die Rolle als Bindungsstelle für Liganden auf der Oberfläche von Leukozyten, die nach Aktivierung durch ICAM-1 durch das Endothel migrieren können. Induziert wird das Gen durch die Zytokine IL-1 und *TNF- α* . [84][85]

VCAM-1

Dieses Gen wird ebenfalls in Endothelzellen des Gefäßsystems exprimiert. Jedoch wird dafür die Stimulation durch Zytokine benötigt. Eine Hochregulation des Gens, die zu einer vermehrten spezifischen Zelloberflächenproteinsynthese führt, kann durch Stimulation mit IL-1 oder

TNF- α bewirkt werden. Das exprimierte Protein vermittelt in seiner Hauptfunktion die Adhäsion von Immunzellen, wie Lymphozyten, Monozyten, Basophilen und Eosinophilen an Endothelzellen der Gefäße. [78][86]

E-Selectin

Als weiteres inflammatorisch bedeutungsvolles Protein wird E-Selectin, exprimiert vom SELE-Gen, ebenfalls in Endothelzellen produziert und dient unter anderem als Adhäsionsmolekül für Monozyten, neutrophile, basophile und eosinophile Leukozyten sowie NK-Zellen und T-Gedächtnis-Zellen. Die Aktivierung und Hochregulation des SELE-Gens geschieht zum Beispiel über *Shearstress* der Gefäßwand und als Teil einer Kaskade über das verwandte Protein P-Selectin, welches selbst durch *TNF- α* , IL-1 oder LPS stark angeregt wird. P-Selectin wird dabei von den Endothelzellen ständig vorgehalten und in den sogenannten Weibel-Palade-Körperchen gespeichert. E-Selectin hingegen wird nach Stimulierung ad hoc produziert und auf der Zelloberfläche exprimiert. [87]

3.4.5.6 Antithrombogene Gene

Tissue Factor

Auch Thromboplastin, auch Faktor III genannt, ist ein Protein der extrinsischen oder exogenen Gerinnungskaskade und wird dauerhaft in subendothelialen Zellen exprimiert. Nach vorausgegangener Stimulation durch *TNF- α* erfährt das Gen eine Hochregulation und wird dann auch von Endothelzellen produziert. *Tissue Factor* wird nach Gewebsverletzungen freigesetzt und bildet dann einen Komplex mit Faktor VIIa, dieser Komplex aktiviert Faktor IX und katalysiert die Konversion von Faktor X zur aktiven Form Faktor Xa. Dieser Vorgang wird als extrinsische oder exogener Pfad der Blutgerinnung benannt. Weiterhin spielt es eine Rolle in der Angiogenese und Apoptose. [79]

Thrombomodulin (THBD)

THBD wird als weiteres Oberflächenprotein auf Endothelzellen dauerhaft exprimiert und dient als Bindungsstelle des zirkulierenden Thrombins im Blut. Auch Monozyten und Mesothelzellen sowie dendritische Zellen exprimieren THBD. Durch die Bindung mit Thrombin wird dessen Gerinnungsaktivität gehemmt und gleichzeitig die Aktivierung von Protein C durch Thrombin gesteigert, sodass THBD eine antikoagulatorische Wirkung innehat. Eine Stimulation mit

inflammatorischen Zytokinen wie *TNF- α* oder IL-1 führt zu einer Abnahme der THBD-Expression auf zellulärer Ebene. [88]

Eine vollständige Liste der verwendeten Zielgene und die dazugehörigen *Primer* findet sich in **Tabelle 6**.

Zielgen	Sequence (5' $\rightarrow$ 3')	Länge
GAPDH homo	<i>Forward Primer:</i> CTGCACCACCAACTGCTTAG <i>Reverse Primer:</i> ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT	20 bp
ICAM-1 homo	<i>Forward Primer:</i> GGCTGGAGCTGTTTGAGAAC <i>Reverse Primer:</i> TGCGTGTCCACCTCTAGGA	20 bp 19 bp
F3 <i>Tissue Factor</i>	<i>Forward Primer:</i> CCAAACCCGTCAATCAAGTC <i>Reverse Primer:</i> ACAATCTCGTCGGTGAGGTC	20 bp
E-Selectin (SELE) homo	<i>Forward Primer:</i> ATCCAAAAGGCTCCAATGTG <i>Reverse Primer:</i> GGACAGCATCGCATCTCAC	20 bp 10 bp
Thrombomodulin homo (THBD)	<i>Forward Primer:</i> TCACAAACCATGCAAATGCT <i>Reverse Primer:</i> CCACCACCAGACAACACAAG	20 bp
VCAM-1 homo	<i>Forward Primer:</i> AAGATGGTCGTGATCCTTGG <i>Reverse Primer:</i> TAGATTCTGGGGTGGTCTCG	20 bp

Tabelle 6: Vollständige Liste der Zielgene und den zugehörigen Basenfolgen der verwendeten Primer

3.5 Oberflächenfunktionalisierung oviner kardialer *dECM*

3.5.1 Oberflächenfunktionalisierung mittels bioaktiver Peptide

In dieser Arbeit wurden in einer Kooperation mit dem *Departement of Material Science and Metallurgical Engineering* der *Universitat Politècnica de Catalunya* in Barcelona, Spanien, anhand einer *in vitro* Studie die Zelladhärenz von humanen Endothelzellen an biofunktionalisierten, dezellularisierten ovinen Pulmonalklappensegeln untersucht. Die Kooperationsarbeitsgruppe um Mas-Moruno et al. hat bereits erfolgreich Metalle mittels eigens entwickelten Peptidkombinationen sog. *short adhesive binding proteins* funktionalisiert und stellte die hier verwendeten bioaktiven Peptide für die *in vitro* Studie zu Verfügung. [89][90]

3.5.2 Peptidaufbau und Funktion

Bei den einzelnen Peptiden handelt es sich um Kombinationen aus einem Anker (*Anchor*), einem Platzhalter (*Spacer*) und einer bioaktiven Sequenz (*Bioactive Sequence*). (Abb. 10) Der *Anchor* dient namensgebend der Verankerung des Peptides in der EZM und besteht aus *Mercaptopropionic Acid*. [89][91] Als *Spacer* wird der Teil des Peptides beschrieben, der als Abstandhalter zwischen zu funktionalisierendem Material und bioaktiver Sequenz fungiert. Die Funktion des *Spacer* besteht darin, der bioaktiven Sequenz den benötigten Raum für die Interaktion mit dem gewünschten Liganden zu ermöglichen und ist daher essenziell für die Funktion des gesamten Peptides. Die *Spacer*-Einheiten der in diesem Versuch verwendeten Peptide bestehen aus *Aminohexanoic Acid*. [89][91] Die *Bioactive Sequence* als wichtigster Bestandteil, vermittelt die gewünschte Eigenschaft des Peptides. [89][91]

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Peptide mit je unterschiedlichen bioaktiven Sequenzen verwendet. Allen ist jedoch gemein, dass sie mit ihren Eigenschaften auf eine bessere und schnellere Zelladhärenz auf dezellularisierten Geweben hinzielen.

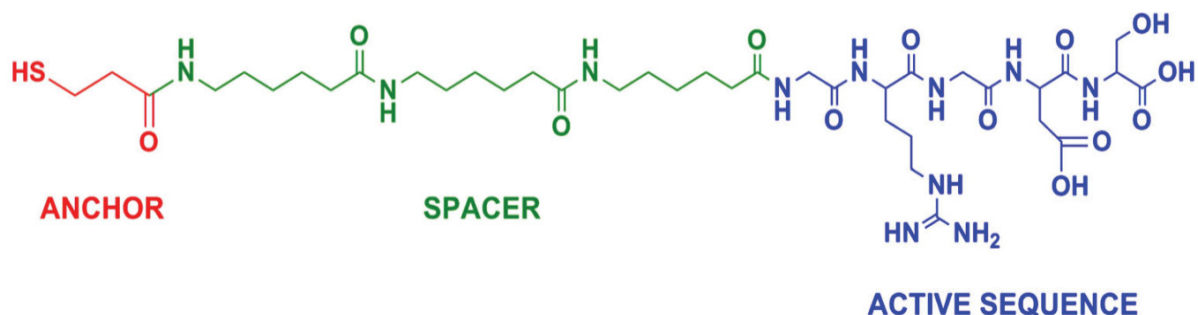


Abb. 10: Peptidaufbau Schema

Darstellung der einzelnen Abschnitte eines beispielhaften zur Biofunktionalisierung genutzten Peptid mit Anker (*Anchor*) auf EZM Seite und Platzhalter (*Spacer*) zur bioaktiven Sequenz (*Active Sequence*) zur Interaktion mit den Zielzellen aus „*Biofunctionalization strategies on tantalum-based materials for osseointegrative applications*“.

Carlos Mas-Moruno et al. (2015)

Im Folgenden soll auf die einzelnen verwendeten Peptide und insbesondere auf die für die Auswahl des Peptides charakterisierenden Motive eingegangen werden:

Peptid RGD (CM-02)

Die bioaktive Sequenz dieses Peptides besteht aus dem sogenannten RGD-Motif, ein Tripeptid bestehend aus Arginin-Glycin-Asparagin (Abb. 11) Das RGD-Motif vermittelt über die ver-

mehrte Bindung an Integrinrezeptoren eine unspezifische, nicht selektive Zelladhäsion, vor allem jedoch an Endothelzellen und Thrombozyten. Zahlreiche EZM Proteine, unter anderem Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin und Osteopontin enthalten diese Sequenz. [89][91]–[94]

Peptid REDV (CM-07)

Dieses Peptid enthält als aktive Einheit die REDV-Sequenz mit der Aminosäurefolge Arg-Glu-Asp-Val und ist aus dem EZM Protein Fibronectin abgeleitet (**Abb. 11**). Es zielt speziell auf Integrine mit den Untereinheiten $\alpha 4\beta 7$ und $\alpha 4\beta 1$ ab. Die genannten Zellintegrine finden sich vornehmlich auf Endothelzelloberflächen, was eine gewisse Spezifität dieses Peptides gegenüber Endothelzellen postuliert. [95][96]

Peptid YIGSR (CM-09)

Ein weiteres Zelladhäsionsmotiv findet sich in diesem Peptid und wurde aus dem in allen Basalmembranen in unterschiedlicher Zusammensetzung vorkommenden Lamininen abgeleitet. Es handelt sich dabei um das YIGSR-Motif, welches aus der Aminosäurekombination Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg besteht (**Abb. 11**). YIGSR zeigte in der Vergangenheit eine Steigerung der Endothelialisierung auf verschiedenen Oberflächen bei einer anzunehmenden Selektivität für Endothelzellen vor allem gegenüber Thrombozyten. [93][97]

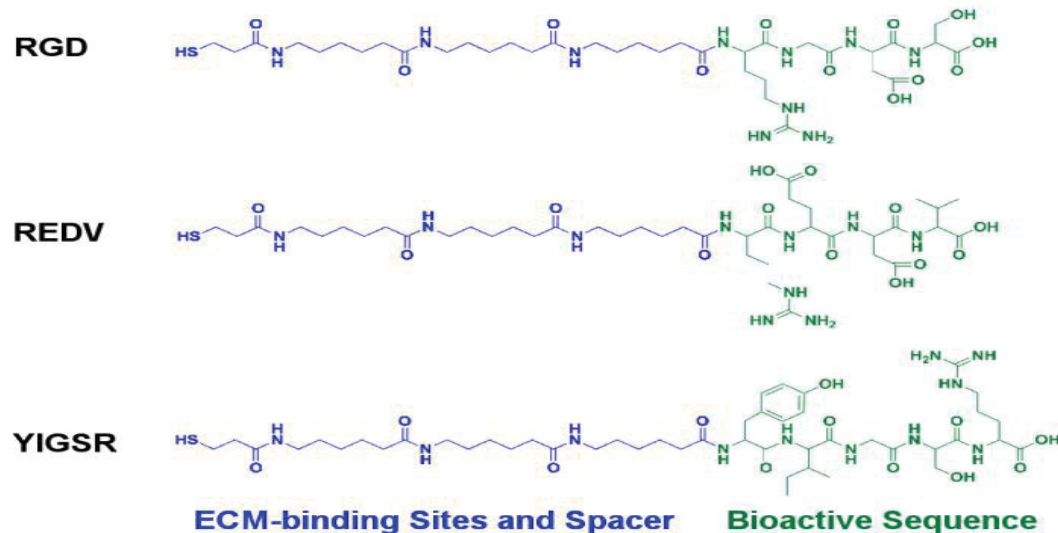


Abb. 11: Molekularer Aufbau der verwendeten synthetischen Peptide

Spezifischer Aufbau der einzelnen verwendeten Peptide mit je gleicher Architektur des EZM *Anker-* und *Spacer*-Struktur (blau) und Darstellung des jeweiligen molekularen Aufbaus der bioaktiven Sequenz (grün) aus „Customized interface biofunctionalization of decellularized extracellular matrix: towards enhanced endothelialization“.

Aubin et al. (2016)

Peptidkombinationen

Um eventuelle synergistische Effekte, durch eine Kombination einzelner Peptide zu evaluieren wurden auch Peptidkombinationen in diesen Versuchsaufbau integriert.

Die Kombination RGD + REDV und YIGSR + REDV waren deshalb zusätzlich Bestandteil zur Untersuchung der einzelnen Peptide dieser Studie.

Fluoreszenzmarkierte Peptide

Durch die Kopplung der Peptide mit dem fluoreszierenden Farbstoff Carboxyfluorescein, können diese mittels eines Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Hierdurch konnte die Anhaftung der Peptide an die EZM visualisiert und nachgewiesen werden. Dafür wurden dezellularisierte Pulmonalsegel sowohl mit fluoreszierenden Peptiden als auch mit nichtfluoreszierenden Peptiden beschichtet.

3.5.3 Präparation der Klappensegel

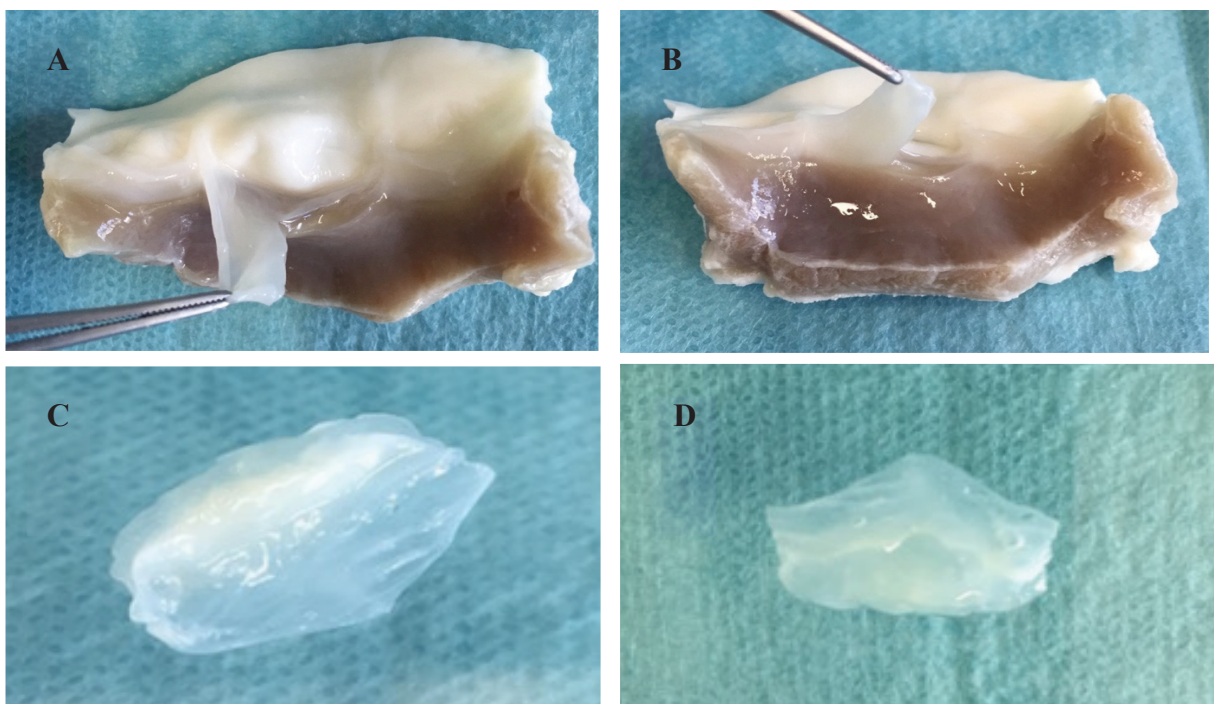


Abb. 12: Ovine Pulmonalklappensegelpräparation

(A) Präparation des dezellularisierten, ovinen Klappensegels durch Abtrennen der Segelbasis, Ansicht von ventral; (B) Ansicht von kaudal; (C) herausgetrenntes Klappensegel, Ansicht von ventral; (D) Ansicht von dorsal.

Die im vorangegangenen Schritt dezellularisierten, ovinen Pulmonalklappen wurden nun in einem weiteren Arbeitsschritt erneut präpariert, da einzig die Pulmonalklappensegel benötigt wurden. Entnommen wurden die Segel immer unmittelbar vor der weiteren Verarbeitung. Die

Präparation fand unter sterilen Bedingungen unterhalb der *Laminar-Flow*-Werkbank statt, es wurde ausschließlich autoklaviertes chirurgisches Besteck verwendet. Zunächst wurde von der Lungenarterienseite aus, mit einer chirurgischen Schere, ein Schnitt durch die Klappenebene vollführt. Die Ringstruktur der Klappe war dadurch aufgehoben und es bot sich eine bandartige Struktur, welche die einzelnen Segel der Klappe in einer Ebene zugänglich machte. (**Abb. 12**) Mittels chirurgischer Pinzetten und Schere wurde jedes einzelne Segel entlang des Übergangs von Endokard zu Myokard vorsichtig abgesetzt (**Abb. 12 a-b**) Die jeweils 3 Segel einer Klappe wurden mit der vom Herzen wegweisenden, nichtventrikulären Seite nach oben in bereitstehende 6-Wellen überführt. Aufgrund der weniger aufgerauten Oberfläche war die herzferne Seite, die Seite der Wahl, um im Verlauf des Versuchsaufbaus eine bessere und einfachere Zelladhäsion zu gewährleisten. Um die empfindlichen Strukturen vor der Austrocknung zu bewahren, wurden die einzelnen Wells mit ca. 1-2 ml sterilem Zellkultur PBS gefüllt.

3.5.4 Peptidbeschichtung der Klappensegel durch das *Disc*-System

Die zuvor in Einzelteilen im Autoklav sterilisierten *Discs* werden unter der *Laminar-Flow*-Werkbank im sterilen Arbeitsbereich aufgebaut. Jede *Disc* besteht aus insgesamt 12 zylindrischen Kammern, von denen jeweils 3 Kammern benutzt wurden, um ein dezellularisiertes Segel einzuspannen. Jeweils ein Segel wurde mit der ventrikulären Seite nach unten auf das gläserne Unterteil einer Kammer platziert. Das Unter- und Oberteil des *Disc*-Systems wurde mithilfe eines Gewindes festgezogen. Abschließend wurden 300 µl steriles PBS, welches der Füllungskapazität eines Zylinders entspricht, in die mit Klappensegeln versehenen Kammern gefüllt und anschließend für 1 h bei 37 °C im Brutschrank gelagert, um die Dichtigkeit zu überprüfen. Haben sich Leckagen gezeigt, wurden diese durch erneute Adjustierung der Segel behoben und erneut auf Dichtigkeit überprüft. Gab es keinerlei Abfall im Flüssigkeitsspiegel, konnte mit der Peptidbeschichtung begonnen werden. Die Peptide wurden durch die Arbeitsgruppe um Mas-Moruno et al. in Barcelona hergestellt und als Pulver zur Weiterverarbeitung gelagert. Um eine 2 mM Peptidlösung herzustellen, wurde das Peptidpulver anhand des spezifischen molekularen Gewichts mit der adäquaten Menge an PBS gelöst. Die Lösung wurde auf 100 µl *Aliquots* verteilt und bei -20 °C gelagert. Für die Beschichtung wurde eine Peptidkonzentration von 100 µM gewählt und die *Aliquots* entsprechend weiter verdünnt. Im Falle der benutzten Peptidkombinationen wurde jeweils 50 µl des unverdünnten Peptides ($c = 2 \text{ mM}$) mit 50 µl des Kombinationspartners zusammengeführt, via Vortex gemischt und anschließend auf die gewünschte Konzentration von 100 µM verdünnt. Jede Versuchskammer mit dem darin befindlichen Klappensegel wurde mit 300 µl Peptidlösung befüllt und das *Disc*-System daraufhin steril verpackt.

Über Nacht konnte die Peptidlösung bei Raumtemperatur und Raumluft auf die *dECM* einwirken. Durch die Bewegung eines Taumelschüttlers wurde eine gleichmäßige Funktionalisierung der Segel gewährleistet. [66]

3.5.5 Versuchsgruppen

Peptid/Kombination	RGD	REDV	YIGSR	RGD/REDV	YIGSR/REDV	Kein Peptid
Zeit	1 Stunde/4 Stunden					
Konzentration	$C_{\text{Peptid}} = 100 \text{ mMol}$					

Tabelle 7: Übersicht über den Versuchsaufbau und die Versuchsgruppen

3.5.6 Besiedlung mit *HUVECs*

Zunächst wurde eine sterile Arbeitsfläche mithilfe von sterilen Abdecktüchern unter der *Laminar-Flow*-Werkbank geschaffen. Die zur Verwendung für diesen Versuch kultivierten *HUVECs* wurden, wie im Zellkulturteil bereits beschrieben, geerntet, ausgezählt und auf eine Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml verdünnt. Dieser Wert entspricht, nach anhand von Vorversuchen ermittelten Daten, einem Besiedlungsgrad der Matrix von optischen 70-80 %. Verbesserungen oder Verschlechterungen der Besiedlungsdichte durch die Beschichtung mit den verschiedenen Peptiden, können bei diesem Besiedlungsgrad optimal festgestellt werden.

Die folgenden Schritte wurden bei jedem der drei zu besiedelnden *Disc*-Systeme pro Versuch analog durchgeführt und folgend mit dem jeweils nächsten Schritt begonnen. Die sorgfältig beschrifteten *Discs* wurden unter der *Laminar-Flow*-Werkbank geöffnet und der Flüssigkeitsspiegel der Peptidlösung erneut kontrolliert, ein Verlust von 10-20 % wurde toleriert. Mithilfe des Zellkultur-Saugers wurde der Flüssigkeitsspiegel abgesaugt. Durch besonders umsichtiges Saugen am Rand der Zylinder wurde die empfindliche, peptidbeschichtete Organmatrix geschont. Jeweils 300 µl steriles Zellkultur PBS diente dazu, jeden Zylinder dreimalig auszuspülen, um damit freie Peptidreste aus dem Versuchsaufbau zu entfernen.

Im Anschluss wurde pro Zylinder 300 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von 300 000 Zellen/ml eingefüllt. Um einen Gasaustausch zu ermöglichen, wurde die Disc mit einem Abstandshalter zwischen der unteren Einheit und dem Deckel des Systems nicht gänzlich verschlossen. Anschließend wurde das System direkt für die gewünschte Zeit in den Zellkulturschrank verbracht. In der ersten Versuchsreihe wurde die Zellsuspension für 1 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, die zweite Versuchsreihe sah eine Inkubationszeit von 4 h bei sonst gleichen Bedingungen vor.

Nach Ablauf der Besiedlungszeit wurden die Discs einzeln und in der Reihenfolge der Besiedlung aus dem Inkubator zur weiteren Verwendung in die *Laminar Flow*-Werkbank überführt. Nach der Zellsuspensionsinkubationszeit waren im weiteren Verlauf alle folgenden Schritte für jede Versuchsgruppe identisch. Die Zellsuspension wurde abgesaugt und der Versuchsraum des Zylinders dreimal mit Zellkultur PBS „gewaschen“. Dadurch wurde sichergestellt, dass alle nicht-adhärenente Zellen ausgewaschen wurden.

Um die adhärenenten und funktionstüchtigen Zellen auszumachen, wurde nun eine Lebendfärbung mittels Calceinfarbstoff durchgeführt. Ein Endothelzellmedium-Farbstoffgemisch wurde dazu mit einer Konzentration von 2 µl Calceinfarbstoff pro Milliliter Medium hergestellt und auf 37 °C aufgewärmt. Da der verwendete Farbstoff lichtempfindlich ist, wurden die folgenden Schritte bei Dämmerlicht und ausgeschaltetem Raumlicht durchgeführt. Zylinder für Zylinder und *Disc* für *Disc* wurden erneut in Reihenfolge der Besiedlung mit 300 µl Farbstoff/Medium vorsichtig per Pipette befüllt und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die *Discs* wurden ab diesem Schritt mithilfe von mehreren Lagen Aluminiumfolie abgedunkelt.

Nach Ablauf der 30 min, in denen der Farbstoff von vitalen *HUVECs* in das Cytoplasma aufgenommen wurde, erfolgte eine erneute Überführung in die *Laminar-Flow*-Werkbank und eine anschließende dreimalige PBS-„Waschung“ der Kammern. Direkt im Anschluss an den PBS Waschschrift wurde nun eine Konservierung des *status quo* via 2 % Formalin in PBS durchgeführt. Das Formalin bewirkt eine Quervernetzung der Zellstrukturen an der EZM und ein post-mortales Ablösen der Zellen wird verhindert. Dadurch war es möglich, alle zeitkritischen Prozesse „einzufrieren“ um eine spätere Vergleichbarkeit der durch Mikroskopaufnahmen erzielten Ergebnisse sicherzustellen. Um eine erhöhte Eigenfluoreszenz der Matrix in Verbindung mit Formalin möglichst gering zu halten, durfte die Einwirkungszeit 8-10 min nicht überschreiten. Nach Applikation von 2 % Formalin/PBS wurden die *Disc*-Systeme bei Raumtemperatur in der *Laminar-Flow*-Werkbank belassen und nach Ablauf der Zeit und unter Berücksichtigung der richtigen Reihenfolge der Applikation sofort mit Zellkultur PBS in einem erneuten dreimaligen Waschschrift behandelt und abermals mit Aluminiumfolie abgedunkelt. Nacheinander wurden nun die *Disc*-Systeme geöffnet und die besiedelten Klappensegel auf vorbeschriftete Objektträger mittels Pinzetten überführt. Um eine Austrocknung der empfindlichen Strukturen zu verhindern, wurden die Klappensegel mit PBS benetzt und in einer feuchten Kammer gelagert. Die Lagerzeit bis zur Aufnahme der Bilder betrug 1 h. Durch die Lagerung soll eine gleichbleibende Aufnahmequalität, im Hinblick auf zeitkritische Veränderungen der Fluoreszenzaktivität sichergestellt werden. Die Aufnahmezeit betrug pro *Disc* und Versuchsgruppe ca. 10-15 Minuten.

3.5.7 Aufnahmetechnik

Die Aufnahme der mikroskopischen Bilder erfolgte nach einem bestimmten standardisierten Schema (**Abb. 13**). Jedes Segel wurde aufgrund des Reaktionszylinders auf einer kreisrunden Fläche besiedelt, diese Fläche wurde in 4 Quadranten unterteilt (links unten, links oben, rechts oben, rechts unten). Für jeden Quadranten wurde jeweils ein fluoreszierendes Bild (Calcein-Signal) und ein Durchlichtbild aufgenommen. Die Einstellungen im Hinblick auf Belichtungszeit, Verstärkungs- und Fluoreszenzlampestärke im Calceinsignalbild wurde so gewählt, dass möglichst jede Zelle mit deutlichem Signal sichtbar wurde, aber eine Überbelichtung und dadurch eine Signalverschmelzung mehrerer Zellen vermieden wurde. Das Durchlichtbild diente der Überprüfung der Kameraposition und der besseren Orientierung hinsichtlich der optimalen Einteilung der Quadranten.

Mit dieser Aufnahmetechnik ergaben sich pro Präparat 4 (plus 4 Durchlicht) Aufnahmen, pro Versuchsgruppe (je $n = 3$) 12 (+12 Durchlicht) Aufnahmen. Bei insgesamt 6 Versuchsgruppen wurden insgesamt 72 Aufnahmen ausgewertet.

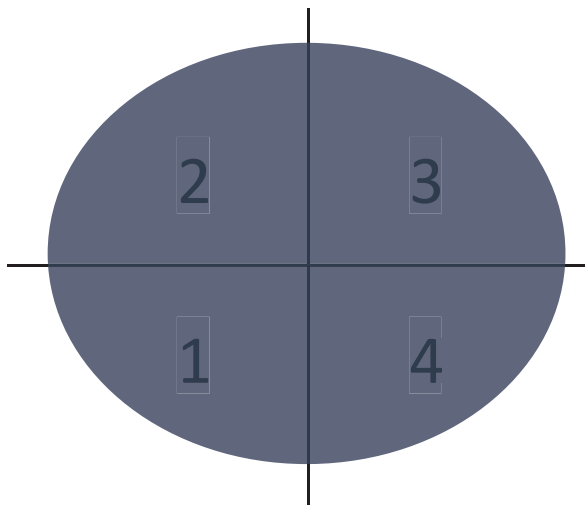


Abb. 13: (1-4) Quadranteneinteilung bei der Aufnahme eines einzelnen Klappensegels

Zunächst Einteilung in 4 Quadranten im Uhrzeigersinn und separate Aufnahme eines Bildes für jeden Quadranten zur anschließenden Auswertung.

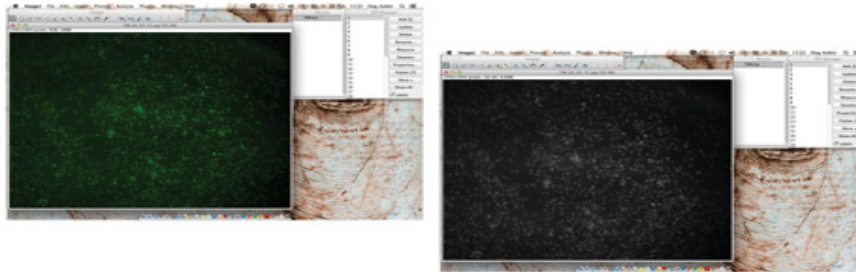
3.5.8 Auswertung

Die Auswertung der Bilder konzentriert sich auf die mit Zellen besetzte Fläche, die im Folgenden als *Area occupied by Cells (AoC)* bezeichnet wird. Die *AoC* kann nach der Auswertungsprozedur in Prozent pro Segelfläche angegeben werden. Die Auswertungen wurden mithilfe des Programms *Image J* und dessen Funktionen, als semiquantitative Analyse vorgenommen.

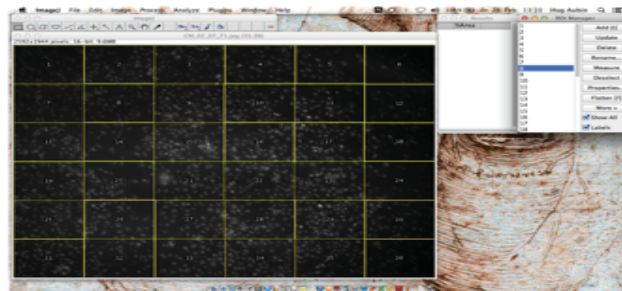
Aus jedem Viertel eines Segels wurde eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme erstellt und anschließend in ein 16-Bit Graustufenbild konvertiert. Die Graustufe ermöglicht die bessere Beurteilbarkeit der Segelfläche, welche aufgrund von Varianzen erschwert ist. Hierzu zählen Faltenbildung und unterschiedliche Belichtungsstärken zwischen Bildmitte und Randbereich, verursacht durch den Fokus der Fluoreszenzlampe. Unter anderem zum selben Zweck dient die Aufteilung des einzelnen Bildes in 36 gleiche Rechtecke. Jedes Rechteck als *Region of Interest (RoI)* wird gesondert bezeichnet und ausgewertet. Jede *RoI* enthält eine bestimmte Anzahl an Zellen, diese werden mithilfe eines individuellen *thresholds* visuell von der Matrix unterschieden. Anhand der gemessenen Pixelanzahl lassen sich die einzelnen Zellen als *AoC* zusammenfassen und als Prozentwert relativ zur Matrixfläche beschreiben. Aus allen 36 Rechtecken wird der Mittelwert gebildet, welcher die *AoC* eines Segelviertels ergibt. Ergo gibt es für jedes Segel 4 x 36 Werte, welche wiederum einen gemeinsamen Mittelwert und damit eine *AoC* je Segel ergeben. Für den gesamten Versuch ergeben sich demnach bei $n = 3$ Segeln pro untersuchtem Peptid und 12 Versuchsgruppen, 36 Mittelwert *AoC* zum Vergleich. Ein schematisches Beispiel des Auswertungsvorgangs zeigt **Abb. 14**.

Auswertungsmethode via Image J

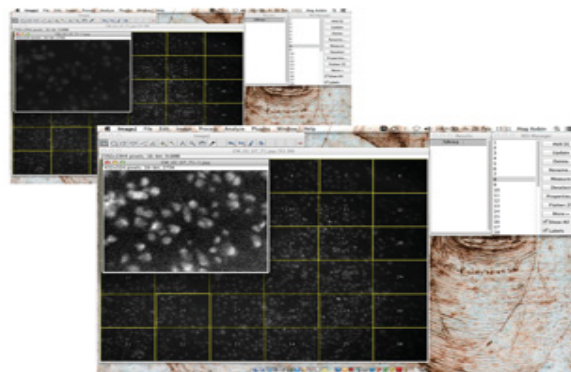
- Umwandlung in 16 Bit Graustufen



- Aufteilung des Bildes in 36 Quadranten



- Einstellen des Kontrastes für jeden Quadranten
→ Ausgleich der Inhomogenität



- Messung der „area occupied by Pixels“
→ Threshold unterscheidet Zelle von ECM
- Ergebnis:
„Area occupied by cells“ in %
- Mittelwert aus 36 Quadranten

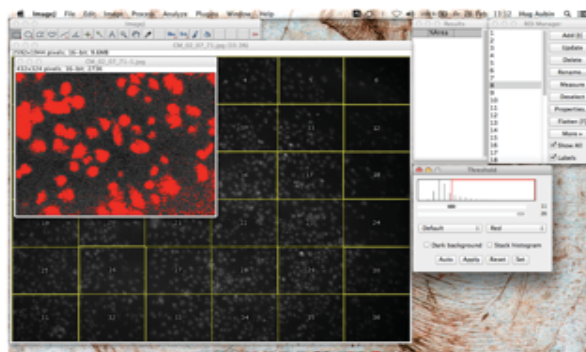


Abb. 14: Darstellung der Auswertungsmethode via Image J

Schrittweise Darstellung der computergestützten Auswertung mittels Bildbearbeitungsprogramm Image J anhand von Screenshots während des Auswertungsvorgangs.

3.6 Probenentnahme und Verarbeitung *human-size* EZM-Konstrukte

Nach Ablauf der Dezellularisierung der ovinen Herzen, wurden diese fotodokumentiert (Kamerafunktion, Apple iPhone 6) und makroskopisch beurteilt. Anschließend wurde das Herz in drei Ebenen eingeteilt (**Abb. 15**):

1. Basisebene (Herzbasis, Herzohren)
2. Klappenebene
3. Apexebene

Es wurden von jeder Ebene eine 1,5 cm x 1,5 cm große Probe aus dem linken Ventrikel, dem rechten Ventrikel und dem Septum entnommen. Die Proben wurden anschließend in 4 % PFA/10 % Sucrose in PBS über Nacht bei 4 °C fixiert und anschließend für die Histologie weiterverarbeitet.

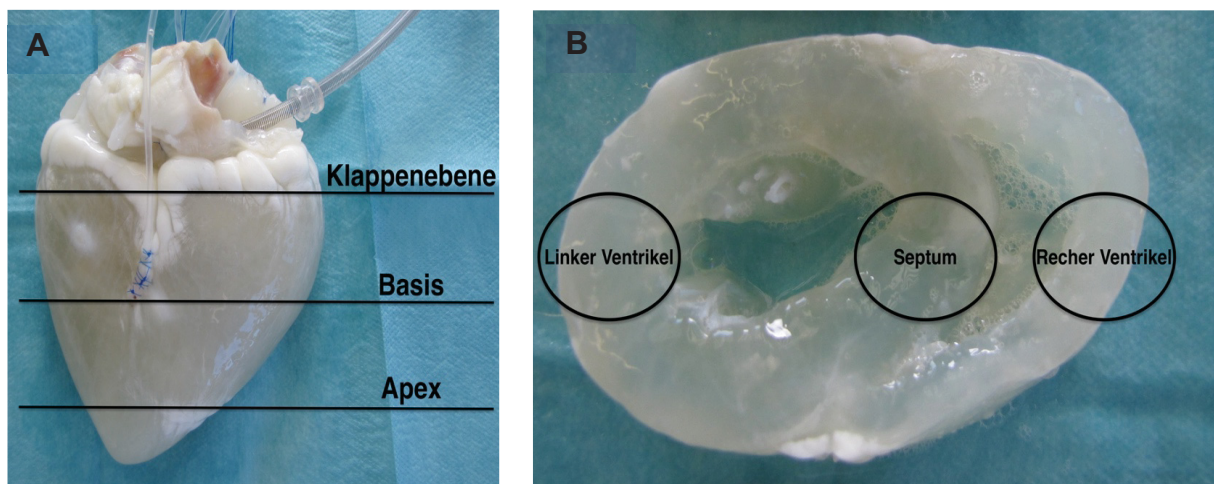


Abb. 15: *In toto* dezellularisiertes ovines Herz

Aufnahme eines zuvor *in toto* dezellularisierten ovinen Herzens. Ohne makroskopischen Nachweis von verbliebenem myoglobinhaltigen zellulären Bestandteilen.

(A) anatomische Ebeneneinteilung der dezellularisierten Herzmatrix; weiterhin einliegende Perfusionskanülen innerhalb der Koronarien und des *Sinus coronarius*; (B) Querschnitt auf Basisebene mit Beschriftung der anatomischen Strukturen als Orte der histologischen Probenentnahme.

3.7 Histologie und Immunhistologie

Folgende Gewebe wurden histologisch oder immunhistologisch aufgearbeitet:

Cryoschnitttechnik

- Natives Rattenmyokard (rechter Ventrikel, linker Ventrikel, Septum, Apex)
- Dezellularisiertes Rattenmyokard (rechter Ventrikel, linker Ventrikel, Septum, Apex)
- Revaskularisiertes Rattenmyokard (rechter Ventrikel, linker Ventrikel, Septum, Apex)

Paraffinschnitttechnik

- Natives ovines Myokard (linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum, Apex)
- Dezellularisiertes ovines Myokard (linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum, Apex)

Für die histologische und immunhistologische Untersuchung der verschiedenen Gewebe, welche mit der Cryoschnitttechnik bearbeitet werden sollten, wurde folgendermaßen verfahren: Direkt im Anschluss an den letzten Dezellularisierungsschritt bzw. direkt nach abschließender Inkubation der re-besiedelten Matrices wurden diese in PBS geschwenkt und danach in 4 % gepufferter Formalinlösung für 10 min fixiert. Die fixierten Gewebe wurden nun mit *Frozen Tissue*-Medium (CryoCompound, Klinipath, Duiven) eingebettet und mithilfe von Isopentan und flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Histologische Präparate der Proben wurden durch ein Leica Cryotom (Modell CM1950) mit einer Schichtdicke von 5-7 µm hergestellt und auf Objektträger aufgezo-gen. Verwahrt wurden diese bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung durch Färbung oder Immunhistochemie. Die für die Paraffinhistologie vorgesehenen Gewebe wurden in ca. 1 cm³ -2 cm³ große Stücke zerteilt, nach Lokalisation im Präparat beschriftet und anschließend in 4 % PFA/10 % Sucrose in PBS für 24 h bei 4 °C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Gewebestücke zunächst gewässert und danach mit der üblichen ansteigenden Alkoholreihe entwässert und daraufhin in Paraffinblöcke eingebettet. Ein Mikrotom (Modell 2035, Reichert-Jung, Leica, Wetzlar) wurde verwendet, um Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 5 µm herzustellen, diese wurden anschließend im Wasserbad gestreckt, auf beschichtete Objektträger aufgebracht und im Wärmeschrank bei 37 °C über 12 h getrocknet. Die histologischen Schnitte und restliche Paraffinblöcke wurden im Anschluss bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung verwahrt.

3.7.1 Histologische Färbungen

Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbung

Die zur Färbung verwendeten histologischen Schnitte waren zwischen 5 und 7 µm dick. Im Falle von in Paraffin eingebetteten Schnitten wurden diese zunächst zweimal für 1 min 100 % Xylol und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe für jeweils 1 min pro Alkoholkonzentration (Alkoholreihe: 100 %, 96 %, 70 %) getaucht. Das Protokoll entspricht der Standardfärbemethode für H.E.-Färbungen.

Die Proben wurden durch 1 min im Aqua dest. Bad rehydriert und direkt im Anschluss mit der Färbung begonnen. Die vorherigen Schritte entfielen für cryohistologische Schnitte. Cryoschnitte und Paraffinschnitte wurden für die Färbung ab diesem Schritt gleichbehandelt. Die Schnitte wurden 1 min ins Hämatoxylinbad, dann 1 min in Aqua dest. zur Spülung getaucht. Anschließend folgte je ein einminütiger Schritt in 5 % Eisessigwasser und eine erneute Spülung für 1 min in Aqua dest. und zweimal 1 min unter fließendem Wasser zur PH-Anhebung (Bläung). Es folgten 1 min in 70 % Alkohol und 5 min in alkoholischem Eosin. Zum Abschluss erfolgte zur Entwässerung eine aufsteigende Alkoholreihe über je 1 min (Alkoholreihe: 70 %, 96 %, 100 %) und 1 min getaucht in Xylol. Nach vollzogener Färbung wurden die Präparate getrocknet und mit wasserlöslichem Eindeckmedium (Roti, HistoKitt, Carl Roth) eingedeckt. Die basophilen Komponenten der Zelle, wie Zellkern und DNA, aber auch das raue endoplasmatische Retikulum mit den eingelagerten Ribosomen färben sich mit dem basischen Farbstoff Hämalaun blauviolett an. Das glatte endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien, Plasmaproteine und extrazelluläre Bestandteile wie Kollagen und Keratin sind eosinophil (acidophil) und färben sich durch den sauren Farbstoff Eosin rot an.

MOVAT-Pentachrom

Für die MOVAT-Pentachromfärbung wurden 5-7 µm Dicke histologische Schnitte verwendet. Paraffinschnitte wurden wie vorangegangen beschrieben, zunächst entparaffiniert und rehydriert bevor mit der eigentlichen Färbung begonnen wurde. Bei Cryoschnitten entfielen diese Schritte.

Die Objektträger wurden als erstes für 10 min in 50 °C warmer Bouinsche Lösung getaucht, dann wurden sie für 10 min unter fließendem Wasser gespült. 5 min in Natriumthiosulfat und ein erneuter Spülschritt mit dreimal 2 min in jeweils frischem Aqua dest. schlossen sich an. Als Farbstoff wurde nun 1 %-iges Alcianblau für 20 min eingesetzt und abermals gespült. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 10 min in alkalischen Alkohol zur Stabilisierung getaucht

und danach gespült. Für 9 min wurde nun mit *Weigerts Working Solution* gefärbt. Es folgte ein ausgedehnter Spülschritt mit 1 min fließendem Wasser und dreimal 2 min Aqua dest. bevor die Präparate in *Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Workingsolution* für 1 min eingetaucht wurden. Es folgte auch hier eine insgesamt fünfminütige Spülung mit 1 min fließendem Wasser und zweimal Aqua dest. für 2 min. Die Objektträger wurden im folgenden Schritt in 5 % Phosphor-Wolframsäure differenziert, mit Eisessig für 5 min und anschließend mit dem bekannten Wasser und Aqua dest. Schritt gespült. Vor dem letzten Färbeschritt wurden die Präparate mit einer Alkoholreihe (je 1 min 96 %-Ethanol, 100 % Ethanol, 100 % Ethanol) insgesamt 3 Minuten dehydratisiert, bevor für 8 min mit Alkoholischem Safran gefärbt wurde. Abschließend wurden die Präparate ein letztes Mal für zweimal 1 min in 100 % Ethanol gespült und für dreimal 5 min in Xylol entfettet, die Objektträger wurden mit Roti Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe) eingedeckt und über Nacht getrocknet.

Arbeitslösung	Inhaltsstoffe
Bouinsche Lösung	300 ml Pikrinsäure, 100 ml 37 %-40 %-Formaldehyd, 20 ml 100 %-Essigsäure
Natriumthiosulfat	10 g Natriumthiosulfat, 100 ml Aqua dest
1 %-iges Alcianblau	2 g Alcianblau, 200 ml Aqua dest.
<i>Weigerts Working Solution</i>	60 ml 2 % alk. Hämatoxylin (10 g Hämatox., 500 ml 96 % Ethanol) + 40 ml Eisenchlorid (12,4 g Eisen-Chlorid-Hexahydrat, 500 ml Aqua dest., 5 ml konz. Salzsäure 32 %-37 %)
<i>Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Workingsolution</i>	80 ml Brilliant-Crocein (4 g Brilliant-Crocein-R, 398 ml Aqua dest.) + 20 ml Säurefuchsin Stock (0,5 g Säurefuchsin, 497,5 ml Aqua dest., 2,5 ml 100 %-Essigsäure)
5 % Phosphor-Wolframsäure	25 g Phosphor-Wolframsäure, 500 ml Aqua dest.
Eisessig	100 % Essigsäure
Alkoholischer Safran	12 g Safran du Gatinais, 200 ml 100 %-Ethanol

Tabelle 8: Übersicht der Arbeitslösungen und deren spezifische Zusammensetzung zur MOVAT-Färbung

3.7.2 Immunhistologische Färbungen

Jeder Objektträger, der für die Immunhistologie vorgesehen war, enthielt mindestens zwei einzelne Schnitte, um eine Negativ-Kontrolle miteinzuschließen. Jeder Schnitt wurde mithilfe eines Fettstifts (DAKO-Pen, Agilent, St. Clara, CA) umrandet. Flüssigkeiten verblieben durch diesen

Schritt dank der Oberflächenspannung innerhalb der Fettstift-Markierung und ermöglichten eine zielgerichtete Anwendung der Färbemittel. Unfixierte Schnitte wurden zunächst für 10 Minuten mit 4 %-Formalin fixiert und anschließend dreimal in PBS gespült, bevor eine Demaskierung mittels 0,25 %-Triton-X-100 für 1 Minute erfolgte. Nach einer erneuten dreimaligen Spülung mit PBS erfolgte der Blockierungsschritt mittels 5 % BSA (Bovines-Serum-Albumin) und 0,1 % *Tween* 20 in PBS, von dieser Lösung wurden 200 µl direkt auf den Objektträger pipettiert und für 3 Minuten in einer Feuchtkammer inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 100 µl der 1. Antikörperlösung (gelöst in 1 % BSA und 0,1 % *Tween* 20) nur auf den Positivschnitt gegeben und wenn nicht anders beschrieben für 1 h bei 37 °C in der Feuchtkammer im Wärmeschrank inkubiert. Die Negativkontrolle wurde mit einfachem PBS benetzt. Bevor der 2. Antikörper aufgetragen wurde, erfolgte eine dreimalige Spülung in 0,1 %-*Tween* 20 in PBS für je 5 min. Der 2. Antikörper, ebenfalls in Lösung mit 1 % BSA und 0,1 %-*Tween* 20 in PBS, wurde im Anschluss für 45 min Einwirkungszeit bei 37 °C und Dunkelheit auf die Schnitte aufgetragen.

Im letzten Schritt wurde erneut für dreimal 5 min mit PBS gespült und anschließend optional *DAPI-Vectashield* (Vector Laboratories, Burlingame, USA) zur Zellkernfärbung verwendet, bevor die Präparate eingedeckt wurden.

3.7.3 Antigene

Von-Willebrand-Faktor

Der Von-Willebrand-Faktor wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Quantität und Funktionalität von Endothelzellen im Rahmen der koronaren Re-Endothelialisierung nachzuweisen. Als 1. Antikörper wurde der *Anti-Human-vWF*-Antikörper von DAKO (Agilent, St. Clara, CA, Art.-Nr.: A0082) in einer Konzentration von 1:300 µl verwendet, welcher mit Alexa Fluor 488 *goat anti mouse*-Antikörper (Invitrogen by Life Technologies, Darmstadt) in einer Konzentration von 1:200 gekoppelt wurde und bei entsprechender Anregung grünes Licht emittiert. [98]

CD31

Der *Cluster of Differentiation 31* auch Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül oder PECAM-1, wird unter anderem auf Thrombozyten, Monozyten aber auch neutrophilen Granulozyten exprimiert. Besonders wird es auch in Endothelzellen exprimiert, wo es hauptsächlich an Verbindungsstellen zwischen zwei benachbarten Zellen vorkommt und so indirekt Zell-Zell-Verbindungen aufdeckt. Die Funktion besteht im Wesentlichen in der Regulation der Leukozyten-Transmigration und als Mechano-Rezeptor für Scherstress im Endothelzellverband.

Die CD31-Färbung wurde deshalb als weiterer Endothelzellmarker zur Detektion der verwendeten *HUVECs* eingesetzt. In dieser Arbeit wurde als 1. Antikörper *Anti-Human-CD31*-Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) in einer Konzentration von 1:100 μ l benutzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als 2. Antikörper wurde Alexa Fluor 488 *Rabbit* (Invitrogen by Life Technologies, Darmstadt) in einer Konzentration 1:200 eingesetzt. [99][100]

Phalloidin

Bei der Phalloidinfärbung handelt es sich um eine Färbung des Zytoskeletts und wurde daher auch zur Darstellung der Zellstruktur im Rahmen der Re-Endothelialisierung verwendet. Zur Färbung wird sich die Affinität des Phallotoxins (Gift des Grünen Knollenblätterpilzes) zu F-Actin in der Zelle zunutze gemacht. F-Actin stellt den Hauptteil der zellulären Mikrofilamente, welche unter anderem die äußere Zellform stabilisieren und bilden. Das verwendete Konjugat *Rhodamine Phalloidin* stammt von Invitrogen by Life Technologies (Darmstadt) und wurde 1:40 verdünnt für die Immunfärbung verwendet. [101]

DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)

Gefärbt wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff *DAPI-Vectashield* (Vector Laboratories, Burlingame, USA), indem 1-2 Tropfen direkt auf den zu untersuchenden Objektträger geträufelt wurden und anschließend mit einem Deckglas abgedeckt wurde. Die Objektträger wurden lichtdicht verpackt und der Farbstoff konnte für mindestens 15 Minuten einwirken, um die Zellkerne und DNA der Zellen in gewünschtem Maße anzufärben. DAPI ist sehr gut geeignet, um bei entsprechender Anregung, Zellen und insbesondere deren Zellkern durch Anlagerung an die Zell-DNA blauviolett anzufärben. DAPI wurde in dieser Arbeit hauptsächlich dazu genutzt, um die Qualität der Dezellularisierung zu evaluieren oder um Endothelzellen in einer wiederbesiedelten Matrix nachzuweisen. [102]

3.7.4 Mikroskopie und Fotodokumentation

Zur Visualisierung der angefertigten Schnitte erfolgte die Mikroskopie mittels DM 2000 Durchlichtmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar). Im Rahmen der immunhistochemischen Präparate wurde zur Anregung der verwendeten Farbstoffe eine an das Mikroskop angeschlossene Fluoreszenzlampe (DFC425C, Leica, Wetzlar) verwendet. Repräsentative Aufnahmen wurden mithilfe der in das Mikroskop integrierten Digitalkamera (Leica, Wetzlar) und der dazugehörigen Software (Leica Application Suite, Leica, Wetzlar) generiert und am angeschlossenen Windows-PC beschriftet und archiviert.

4 Ergebnisse

Dieses Kapitel dient der Präsentation und Erläuterung der gesammelten Ergebnisse dieser Arbeit, die sich mit Optimierungskonzepten im Bereich des kardiovaskulären *Tissue Engineering* auseinandergesetzt hat. Thematisch sind die erzielten Ergebnisse in folgende Kernbereiche unterteilt:

1. Funktionelle Re-Endothelialisierung myokardialer Ratten-*dECM* mit humanen Endothelzellen
2. Oberflächen-Biofunktionalisierung von dezellularisierten ovinen Herzklappensegeln mit bioaktiven Peptiden
3. Herstellung von *human-size dECM*-Gerüsten durch die perfusionsbasierte *in toto* Dezellularisierung von ovinen Herzen anhand der Modifizierung eines etablierten Protokolls zur Kleintierherz-Dezellularisierung

4.1 Funktionelle Re-Endothelialisierung kardialer *dECM*

Ein Teilziel dieser Arbeit bestand in der endothelialen Re-Besiedlung des Gefäßsystems der dezellularisierten Rattenherzen. Als Modell diente hierbei das in Kapitel 3.4.2. vorgestellte *Tissue-Flap*-Modell. Zur Re-Endothelialisierung wurden *HUVECs* verwendet. Die re-endothelialisierten Konstrukte wurden histomorphologisch, immunhistologisch und molekularbiologisch evaluiert. Aufgrund der umfangreichen Vorarbeiten mit diesem Modell und insbesondere der *in toto* Dezellularisierung von Rattenherzen [38][103] sowie kontinuierlichen Qualitätskontrollen innerhalb der Arbeitsgruppe, ist der nahezu vollständige Dezellularisierungsgrad der Proben als gegeben anzusehen. Wiederholte Stichproben, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, zeigten stets eine fast vollständige Freiheit von verbleibendem Zellmaterial, innerhalb des für die Versuche verwendeten Probenmaterials.

4.1.1 *In toto* Herzdezellularisierung von Rattenherzen

Insgesamt wurden 28 Rattenherzen für die Versuche dezellularisiert. Dabei wurden 8 Herzen für die histologische Auswertung und 20 Herzen für die molekularbiologische Analyse und deren Vorversuche verwendet. Für die umfangreiche Evaluation des Dezellularisierungsergebnis wird an dieser Stelle auf die Arbeit „*Decellularized Whole Heart for Bioartificial Heart*“ von Aubin et al. (2013) verwiesen. [103]

4.1.2 Selektive Re-Endothelialisierung des Rattenherzgefäßsystems

Für die selektive Re-Endothelialisierung des kardialen Gefäßsystems mit *HUVECs* wurden 8 Rattenherzen mit ca. $4\text{--}5 \times 10^6$ Zellen erfolgreich wiederbesiedelt und histologisch ausgewertet. Die im Folgenden gezeigten Aufnahmen der histologischen Schnitte und Färbungen entsprechen repräsentativen Aufnahmen des verwendeten Probenmaterials von Re-Endothelialisierungen im *Tissue-Flap*-Modell.

4.1.2.1 DAPI-Färbung

Die DAPI-Färbung wurde verwendet, um die erfolgreiche Re-Endothelialisierung immunhistologisch nachzuweisen. Damit ergab sich eine Screeningmethode, um Regionen mit besonders hohem Anteil an wiederbesiedelten Gefäßen zu identifizieren. Die dargestellten **Abb. 16a-d** zeigen re-endothelialisierte Gefäße mit verschiedenen Durchmessern. Die hellblauen, leuchtenden und punktförmigen Strukturen sind jeweils einzelnen Zellkernen der eingebrachten *HUVECs* zuzuordnen.

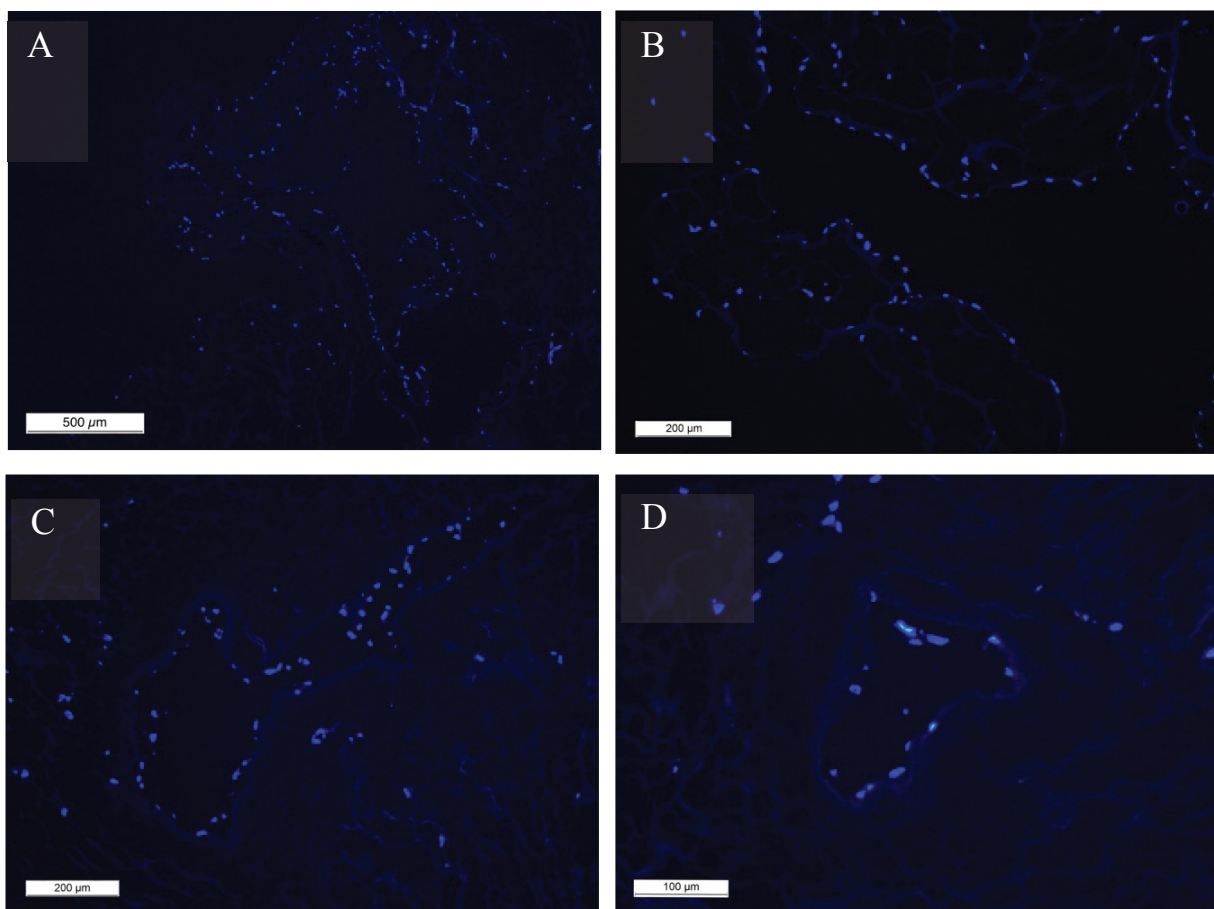


Abb. 16: DAPI-Färbung von *dECM* nach Re-Endothelialisierung mittels *HUVECs*

Mikroskopische Ansicht repräsentativer histologischer Schnitte eines *dECM Tissue Flap* nach Re-Endothelialisierung als 6 µm Cryoschnitt. (A)-(D) Anschnitte re-endothelialisierter Gefäße untersch. Kalibers mit kontinuierlicher Gefäßauskleidung durch *HUVECs* (blaues DAPI-Signal, Maßstab 500 µm (50 x), 200 µm (100 x), 100 µm (200 x)).

Die fluoreszierenden Zellkerne zeigen eine deutliche und nahezu kontinuierliche Zellschicht im Koronarbett. **Abb. 16a** und **d** zeigen darüber hinaus, dass sowohl größere als auch kleinere Gefäßvolumina erfolgreich mit Zellen benetzt wurden. Die Schnittserien, die zu den **Abb. 16a** und **d** vergleichbare Merkmale zeigten, wurden dann erweiterten immunhistologischen Färbungen unterzogen.

4.1.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Die H.E.-Färbung dient der Darstellung der EZM mit ihren Proteinen, vordergründig Kollagen, welches sich in starkem Rot darstellt. Weitere acidophile Bestandteile wie Zellplasmae, Mitochondrien und glattes ER werden ebenfalls angefärbt und erscheinen eher als hellrosa bis rosaviolette Strukturen. Basophile Strukturen, wie die Zellkerne und die enthaltene DNS, erscheinen dunkelviolett bis bläulich schwarz. Die dargestellten **Abb. 17a-d** zeigen vordergründig die Zellfreiheit eines mit Detergens behandelten Gewebes und das gut erhaltene, aus Proteinen bestehende Zellgerüst. Dabei erscheint die Struktur der EZM wabenförmig, leicht aufgelockert bis brüchig. Außerhalb der Gefäße sind keinerlei zellulären Rückstände sichtbar.

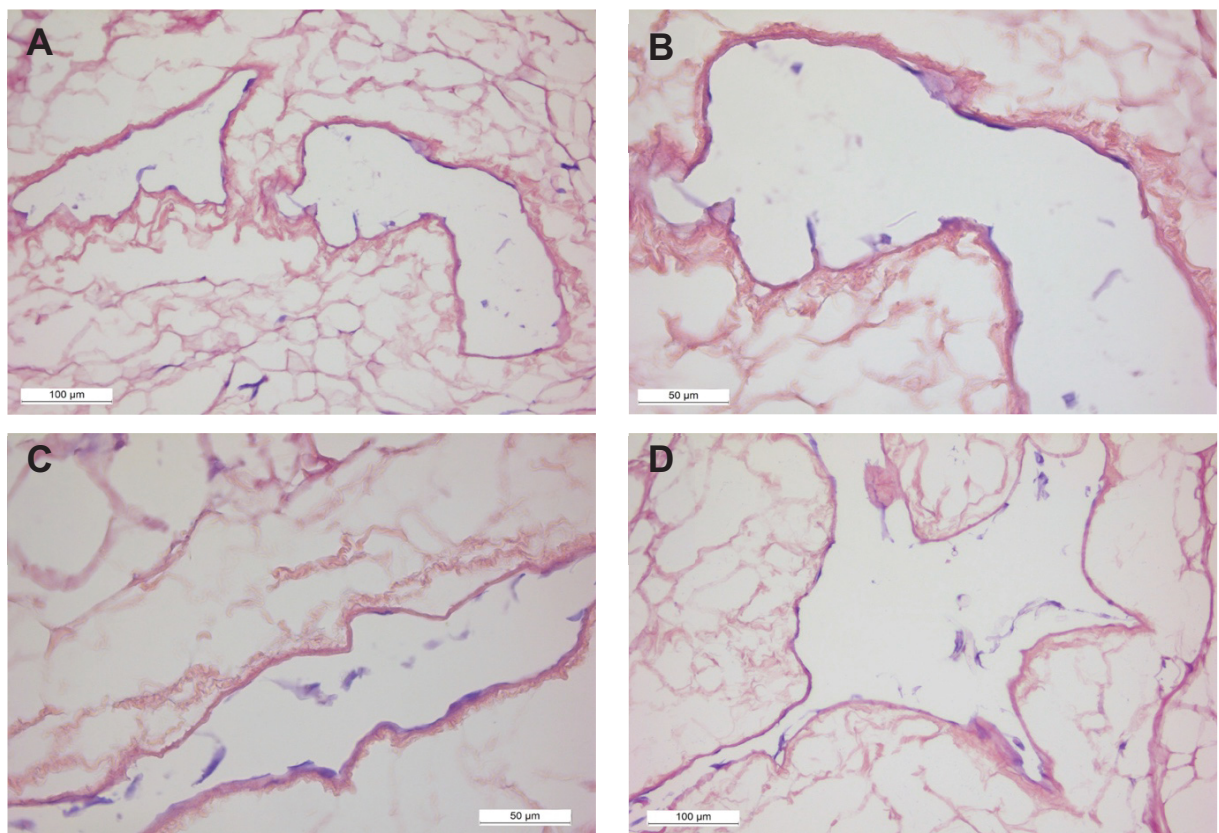


Abb. 17: H.E.-Färbung von *dECM* nach Re-Endothelialisierung mittels *HUVECs*

Mikroskopische Ansicht repräsentativer histologischer Schnitte eines *dECM Tissue Flap* nach Re-Endothelialisierung und H.E. Färbung als 6 µm Cryoschnitt. (A)-(D) Anschnitte re-endothelialisierter Gefäße untersch. Kalibers mit kontinuierlicher Gefäßauskleidung durch *HUVECs*. Zellfreie peri-vaskuläre EZM. (Maßstab 100 µm (200 x), 50 µm (400 x))

Das Augenmerk der repräsentativen Bilderauswahl liegt auf dem Gefäßsystem. **Abb. 17a** zeigt zwei benachbarte Gefäße. Man erkennt die blau-schwarzen Zellkerne der *HUVECs*, welche das Gefäß auskleiden und eine Art rudimentäre Endothelschicht bilden. **Abb. 17b** zeigt eine höhere Vergrößerung eines der Gefäße und verdeutlicht die lang gezogene Form der Zellen. Die **Abb. 17c** und **d** illustrieren, dass sowohl kleinere als auch größere bis große Gefäße mit Durchmessern von ca. 350 μm im Falle von **Abb. 17d** erfolgreich re-besiedelt wurden.

4.1.2.3 Movat-Pentachromfärbung

Mittels der Movat-Pentachromfärbung können unterschiedliche strukturelle Bestandteile der EZM visualisiert werden. In **Abb. 18a-d** zeigen sich in dunkelviolett bis schwarzer Färbung Zellkerne der re-besiedelten *HUVECs* am Rand der angeschnittenen Gefäße.

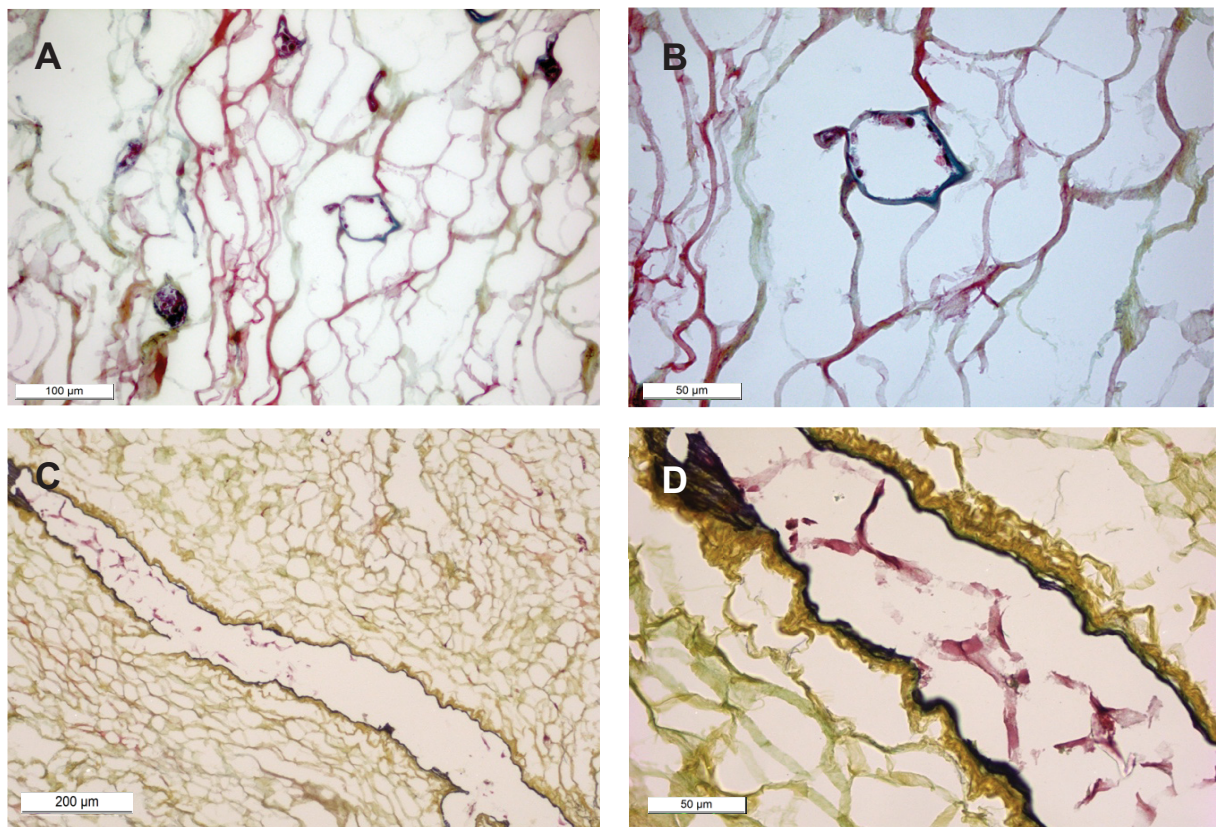


Abb. 18: MOVAT Färbung von dECM nach Re-Endothelialisierung mittels HUVEC

Mikroskopische Ansicht repräsentativer histologischer Schnitte eines *dECM Tissue Flap* nach Re-Endothelialisierung und MOVAT Färbung als 6 μm Cryoschnitt. (A)-(B) Übersichtsaufnahme und Detailansicht Querschnitt re-endothelialisierter Gefäße mit kontinuierlicher Gefäßauskleidung durch *HUVECs*, Maßstab 100 μm (200 x), 50 μm (400 x); (C)-(D) Übersichtsaufnahme und Detailansicht Längsschnitt re-endothelialisierter Gefäße mit kontinuierlicher Gefäßauskleidung durch *HUVECs*, Maßstab 200 μm (100 x), 50 μm (400 x).

Ebenso schwarz färben sich elastische Fasern, wie sie in den Wänden von Gefäßen zu finden sind. Grünlich und bläulich färben sich saure Strukturen wie Glykosaminoglykane und andere

Grundsubstanzen an. Kollagene werden gelb bis dunkelorange dargestellt. Im Mengenverhältnis dominant erscheinen in den gefertigten Schnitten, proteinreiche extrazelluläre Bestandteile wie die gelblichen Kollagenfasern und die grün-blauen Glykosaminoglykane. Myokardiale Zellbestandteile, welche sich in tiefer roter Farbe zeigen würden, wurden in den dezellularisierten Schnitten analog den **Abb. 18a-e** nicht nachgewiesen.

Die dargestellten runden bzw. länglichen Strukturen der **Abb. 19a-d** entsprechen Gefäßen in Anschnitten aus verschiedenen Richtungen. Dabei handelt es sich um re-besiedelte kleinere Gefäße mit max. Durchmessern von ca. 40 µm – 50 µm. In den **Abb. 19a** und **b** lassen sich die einzelnen Zellkerne der *HUVECs* an der Wand des Gefäßgerüsts erkennen. Bei genauerer Betrachtung lassen sich in **Abb. 19a** neben den schwarz gefärbten Kernen auch rötlich gefärbte Zytoplasmareste erkennen. Am wahrscheinlichsten handelt es sich um acidophile Bestandteile, wie das glatte ER oder Mitochondrienansammlungen. **Abb. 19c** und **d** zeigen die identische längliche Struktur in verschiedenem Maßstab. Hierbei handelt es sich um ein weiteres Gefäß mit schwarz angefärbten Zellkernen der *HUVECs* am Rand des Lumens. Bei genauerer Betrachtung lässt sich eine kontinuierliche einschichtige Zellbesiedlung nachvollziehen.

4.1.2.4 Calcein-Färbung

Eine der besonderen Vorteile des *Tissue-Flap*-Modells zeigt sich bei den folgenden Aufnahmen. Durch die *Tissue-Flap*-Architektur kann die Gefäßstruktur innerhalb des Myokards, ausgehend von den größeren Gefäßen der Koronararterien, bis hin zu kleineren Gefäßstämmen sichtbar gemacht werden. Die verwendete Calcein-Färbung, bei der die vitalen Zellen, den Farbstoff in ihr Zytoplasma aufnehmen und aktivieren, macht es möglich, die einzelnen Zellen und Zellverbände innerhalb des Gefäßsystems zu visualisieren.

Abb. 19a und **b** wurden durch ein Konfokal-Laser Mikroskop (Konfokalmikroskop, LSM 700, Carl Zeiss, Jena) aufgenommen. Deutlich erkennbar hierbei ist der Besiedlungserfolg über mehrere Abzweigungen der Gefäßbäume hinweg. Die grünlich fluoreszierenden Punkte entsprechen dabei einzelnen Zellen und Zellverbänden der eingebrachten *HUVECs*. **Abb. 20c** und **d** wurden mit einem Durchlichtmikroskop (Leica DM 2000 Durchlichtmikroskop, Leica Microsystems, Wetzlar) aufgenommen und zeigen kontinuierlich re-besiedelte Gefäßstraßen. Darüber hinaus kann man innerhalb der Endothelschicht nur wenige bis keine Lücken erkennen. Die hohe Eigenfluoreszenz des *Flaps*, in leuchtendem Grün, erschwerte die Aufnahme verwertbarer Bilder und die Unterscheidung zwischen Zellen und Matrix.

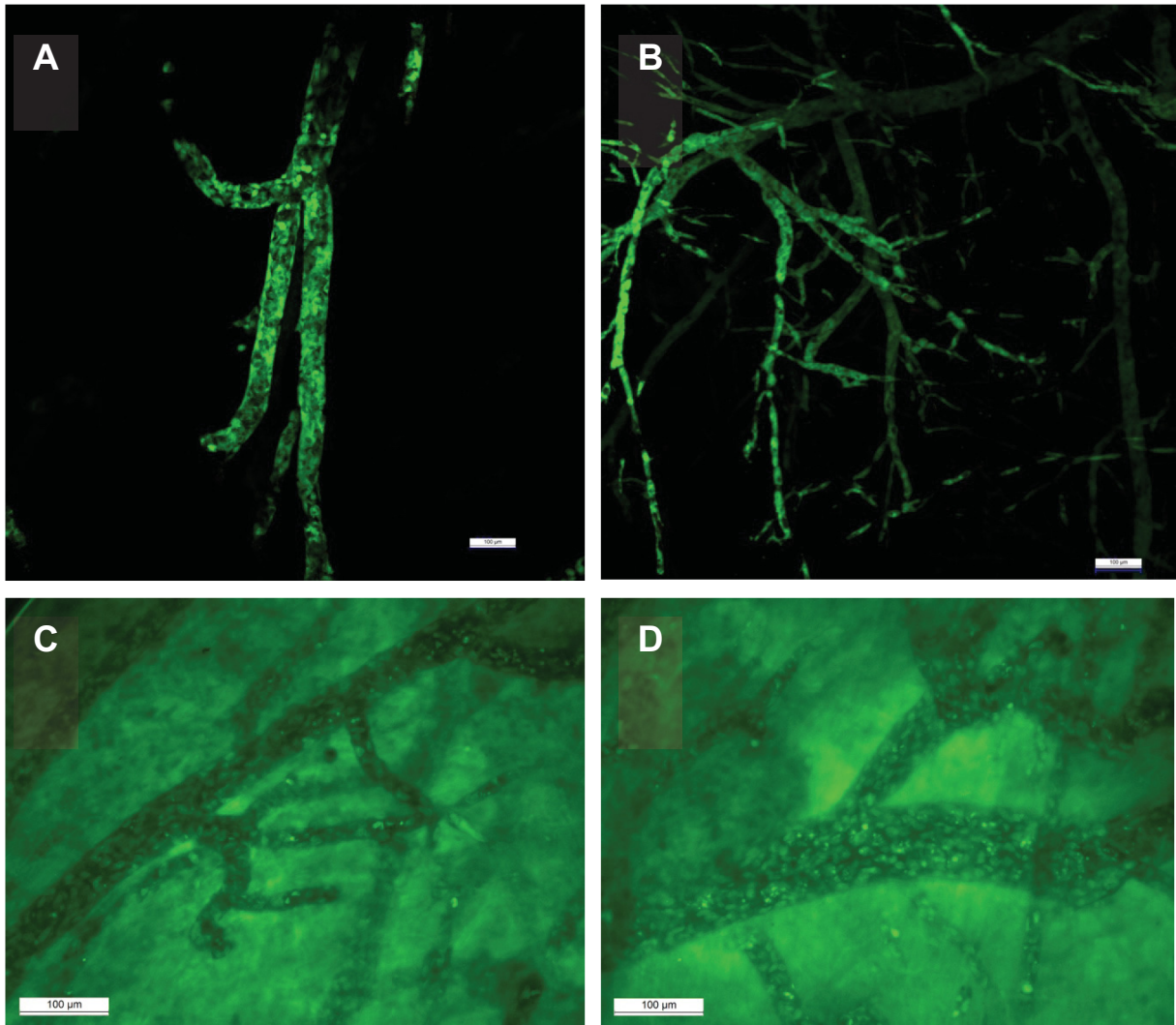


Abb. 19: Darstellung der re-endothelialisierten Gefäßarchitektur eines *dECM Tissue Flap*

(A)-(B) Repräsentative Aufnahmen eines re-endothelialisierten *dECM Tissue Flap* nach Calcein-Färbung der vitalen *HUVECs* mit Darstellung der verzweigten natürlichen 3-D-Gefäßarchitektur durch ein Konfokal-Laser-Mikroskop (Maßstab 100 µm (200 x)); (C)-(D) Repräsentative Aufnahmen eines re-endothelialisierten *dECM Tissue Flap* nach Calcein-Färbung der zahlreichen vitalen und in Kontinuität das Lumen ausfüllenden *HUVECs* durch ein Durchlichtmikroskop (Maßstab 100 µm (200 x)).

4.1.2.5 Von-Willebrand-Faktor Immunfärbung

Da alle Endothelzellen Von-Willebrand-Faktor (vWF) produzieren, stellt die Antikörper-Färbung des Faktors eine suffiziente Methode zum Nachweis von Endothel dar. Die **Abb. 20a-d** zeigen immungefärbte Cryoschnitte von zuvor re-endothelialisierten *Tissue Flaps*. In Blau zeigen sich die DAPI-gefärbten Zellkerne der *HUVECs* in regelmäßigen Abständen an der Gefäßwand. Die Zellkörper kleiden das Lumen analog einer Endothelschicht dicht aus. Anhand **Abb. 20** gut zu erkennen ist die gleichmäßige Auskleidung von Gefäßen mit unterschiedlichen Kalibern. Grün fluoreszierend erscheint der gespeicherte oder von den Zellen ausgeschüttete Von-Willebrand-Faktor. Bei genauer Betrachtung erkennt man eine nahezu kontinuierliche grüne Fluoreszenz zwischen zwei benachbarten in blau leuchtenden Zellkernen. Dies deutet

ebenfalls auf einen suffizienten kontinuierlichen Besiedlungserfolg mit miteinander in Verbindung stehenden Zellverbänden hin. Auf die Ausbildung einer zumindest rudimentär funktionellen Endothelschicht durch die eingebrachten *HUVECs* lässt sich anhand der deutlichen vWF-Speicherung respektive Ausschüttung schließen. In allen re-besiedelten Proben konnten vWF-positive Zellen nachgewiesen werden.

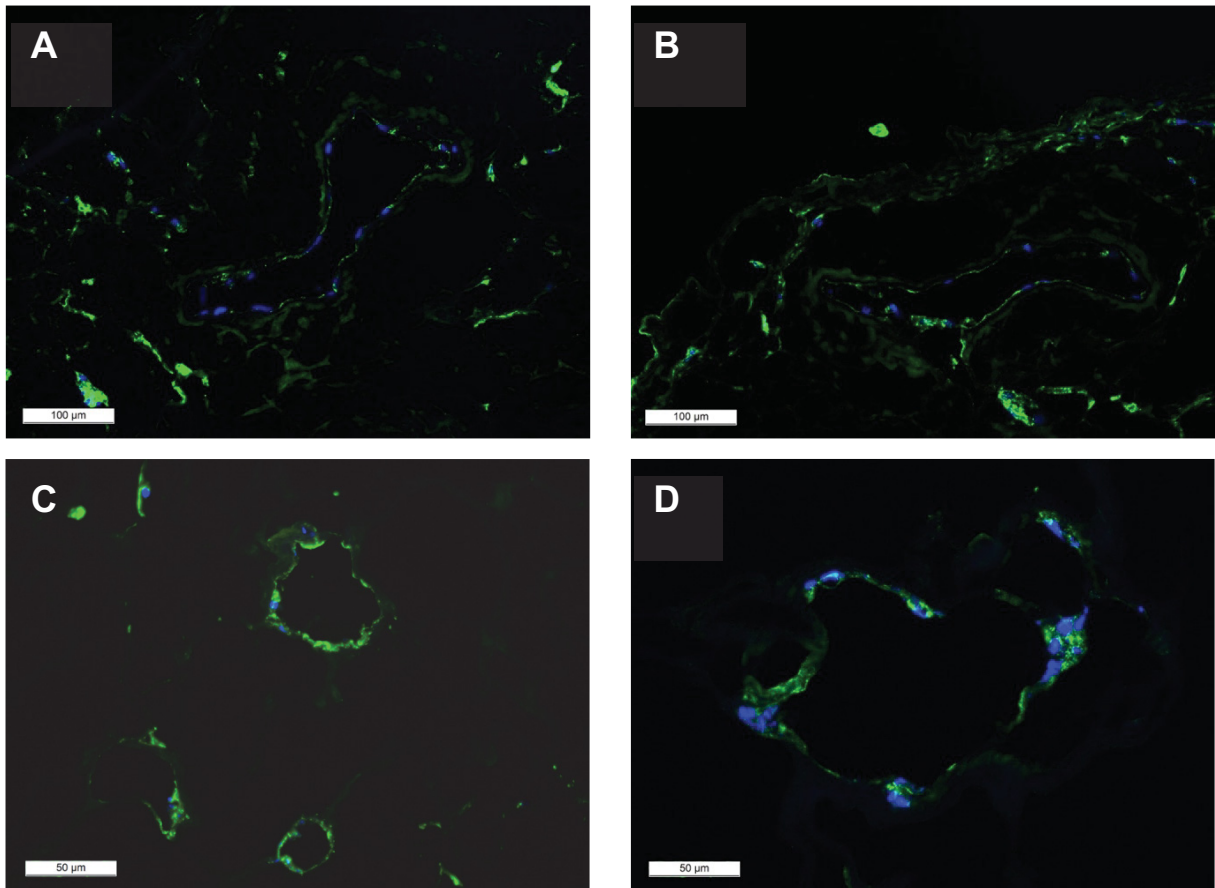


Abb. 20: Nachweis von *HUVECs* nach Re-endothelialisierung eines *dECM Tissue Flap* durch vWF-Ausschüttung im Gefäßsystem

(A)-(D) Repräsentative Aufnahmen eines re-endothelialisierten *dECM Tissue Flap* nach Immunfärbung der vWF Aktivität und Zellkerne der re-endothelialisierten *HUVECs* am Rande der angeschnittenen Gefäßlumen unterschiedlichen Kalibers ((A)-(B) Maßstab 100 µm (200 x); (C)-(D) 50 µm (400 x), 6 µm Cryoschnitt), blaues Signal = DAPI, grünes Signal = Von-Willebrand-Aktivität.

4.1.2.6 CD31-Färbung

Das Immunglobulin und Membranglykoprotein CD31 findet sich unter anderem auf Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und Plättchen. Darüber hinaus ist es ein oft verwendeter Endothelzellmarker. CD 31-positive Zellen konnten in allen re-endothelialisierten Proben nachgewiesen werden. Die **Abb. 21a** und **b** zeigen in grüner Fluoreszenz, dass eine koronare Re-Endothelialisierung mit *HUVECs* im Stande ist, Zellverbände innerhalb von Gefäßen auszubilden. Deutlich ist zu erkennen, wie die blauen DAPI-markierten Zellkerne der *HUVECs* über

CD31-haltige Interzellverbindungen vernetzt sind und die Oberfläche des Lumens auskleiden. Die DAPI-markierten Zellkerne zeigen erneut ein durchgängig besiedeltes und darüber hinaus vernetztes Gefäßsystem.

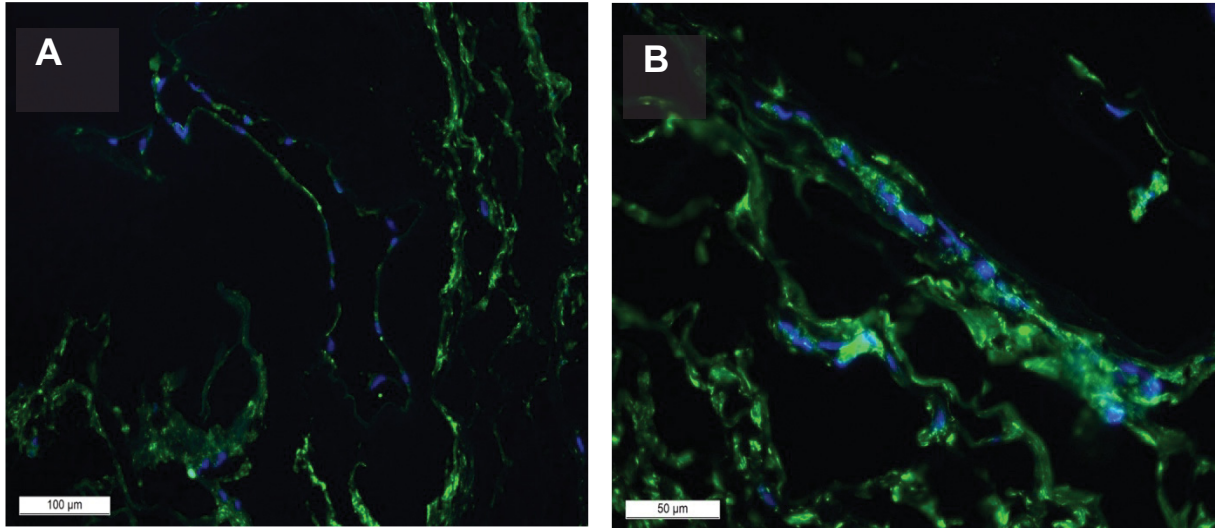


Abb. 21: Nachweis von HUVECs nach Re-endothelialisierung eines *dECM Tissue Flap* durch Endothelmarker CD31 im Gefäßsystem

(A)-(B) Repräsentative Aufnahmen eines re-endothelialisierten *dECM Tissue Flap* nach Immunfärbung des Endothelmarkers CD31 und Zellkerne der re-endothelialisierten HUVECs am Rand mehrerer Gefäßlumen ((A) Maßstab 100 µm (200 x); (B) 50 µm (400 x), 6 µm Cryoschnitt, blaues Signal = DAPI, grünes Signal = CD-31).

4.1.2.7 Phalloidin-Färbung

Diese spezielle Färbung von interzellulärem F-Actin ermöglicht es, Rückschlüsse auf das Zytoskelett einer eukaryotischen Zelle zu ziehen und dessen Ausbreitung zu studieren. In blauer Fluoreszenz erscheinen, wie bereits gewohnt, die DAPI-markierten Zellkerne der HUVECs.

In roter, fluoreszierender Farbe wird das zelluläre F-Actin der eingebrachten HUVECs sichtbar gemacht. **Abb. 22a** zeigt dabei die enge Lagebeziehung der Zellen zueinander, bei der sich Zytoskelett dicht an Zytoskelett drängt. Gut erkennbar ist auch, dass die Lumina der Gefäße frei durchgängig bleiben.

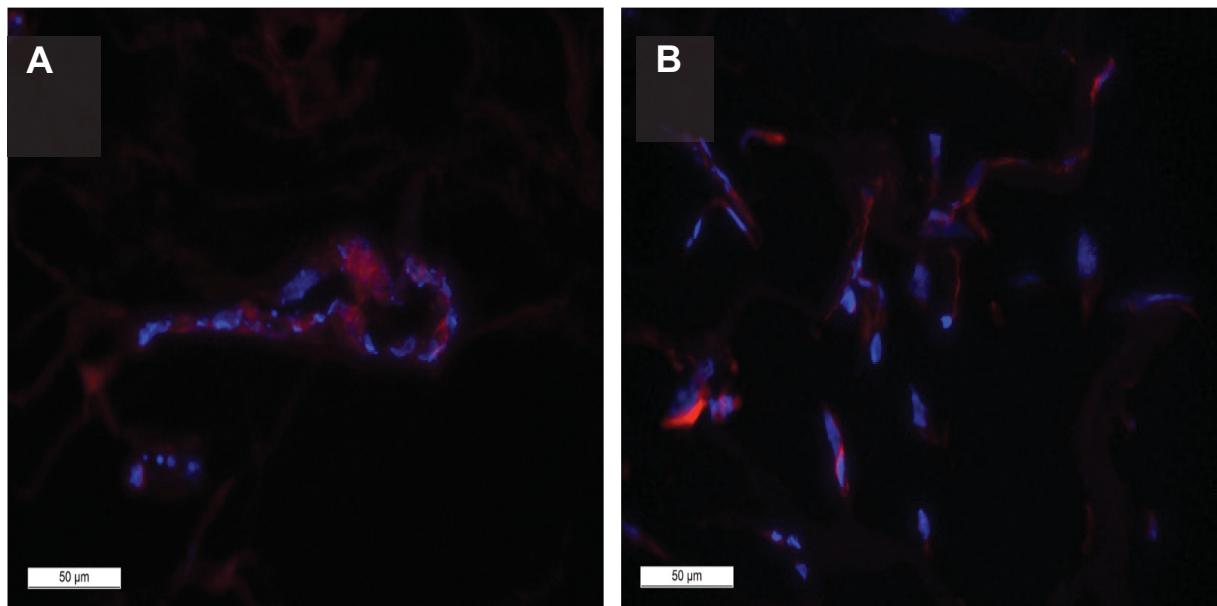


Abb. 22: Darstellung des Zytoskelett re-endothelialisierter HUVECs durch Phalloidin-Färbung

(A)-(B) Repräsentative Aufnahmen eines re-endothelialisierten *dECM Tissue Flap* nach Phalloidin-Immunfärbung zum Nachweis von F-Actin im Zytoskelett und der Zellkerne der re-endothelialisierten HUVECs ((A)-(B) Maßstab 50 µm (400 x), 6 µm Cryoschnitt, blaues Signal = DAPI, rotes Signal = F-Actin-Aktivität).

4.1.3 *TNF-α*-Stimulationstest

Um die Re-Endothelialisierung durch HUVECs auch molekulargenetisch zu evaluieren, wurden insgesamt fünf als Endothelzellmarker etablierte Zielgene identifiziert. Drei Zielgene, die für die inflammatorische Aktivität und zwei Gene, die für eine antithrombogene Aktivität auf endothelialen Zellen exprimieren, wurden mittels *rt-PCR* untersucht. Evaluiert wurde die adäquate molekulargenetische Reaktion und Zellfunktionalität der HUVECs, nach einer Stimulation durch *TNF-α*. Als Positiv-Kontrolle erfolgte die Stimulation von HUVECs in einem 6-Well unter Zellkultur-Bedingungen. Damit verglichen wurde die *TNF-α*-Stimulation der re-besiedelten HUVECs im *Tissue-Flap*-Modell. Der besseren Übersicht dienend, werden in den folgenden Abbildungen die Positiv-Kontrollgruppe als 2-D-Modell und die *Tissue-Flap*-Modell Gruppe als 3-D-Modell bezeichnet. Die Extraktion von RNA gestaltete sich im Falle der Zellkultur-Kontrolle als problemlos und erreichte sowohl quantitativ als auch qualitativ für die anschließenden *rt-PCR*-Untersuchungen ausreichende Werte. Die per *NanoChip* (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent, St. Clara, CA, USA) gemessenen RIN-Werte rangierten von 9,5 bis 10 und sind in **Abb. 23** dargestellt. Es wurden jeweils $n = 3$ Zellproben der Kontroll- und der Experimentalgruppe in Bezug auf die Zielgene mittels *rt-PCR* untersucht.

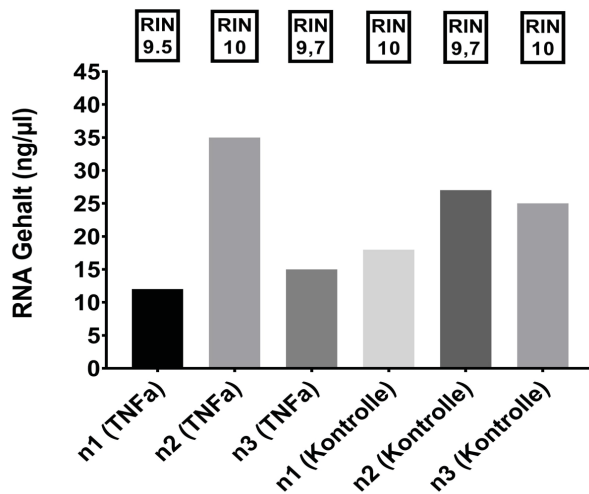


Abb. 23: RNA-Gehalt und zugehörige RIN-Werte *HUVECs* im 2-D-Modell

x-Achse: Auftrag der Proben n1-n3 der *TNF-α*-Stimulations- und der Kontrollgruppe mit zugehörigen mittels *NanoChip* (Agilent 2100 Bioanalyzer) gemessenen RIN-Werten (*RNA Integrity Number*).

y-Achse: Einzelner RNA-Gehalt in ng/μl der einzelnen Proben n1-n3 der *TNF-α* Stimulations- und der Kontrollgruppe, gemessen mittels *NanoChip* (Agilent 2100 Bioanalyzer).

Für das *Tissue-Flap*-Modell zeigten sich im Allgemeinen deutlich geringere absolute RNA-Ausbeuten bei deutlich höherem Zelleinsatz. Darüber hinaus ergab die Evaluation der RNA Qualität durch *NanoDrop* (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) und *NanoChip*-Analyse (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent, St. Clara, CA, USA) hochgradig degradierte RNA im Großteil der Proben. **Abb. 24** stellt die Ergebnisse graphisch da.

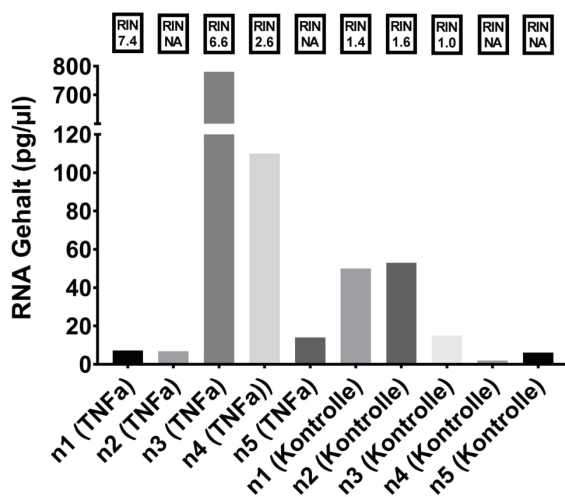


Abb. 24: RNA-Gehalt und zugehörige RIN Werte *HUVECs* im 3-D-Modell

x-Achse: Auftrag der Proben n1-n5 der *TNF-α*-Stimulations- und der Kontrollgruppe mit zugehörigen mittels *NanoChip* (Agilent 2100 Bioanalyzer) gemessenen RIN-Werten (*RNA Integrity Number*, NA=nicht messbar).

y-Achse: Einzelner RNA-Gehalt in pg/μl der einzelnen Proben n1-n5 der *TNF-α*-Stimulations- und der Kontrollgruppe, gemessen mittels *NanoChip* (Agilent 2100 Bioanalyzer).

Die gemessenen RIN-Werte rangierten von „nicht messbar“ im schlechtesten Fall bis 7,6 als höchsten RIN-Wert. Bei insgesamt 5 Re-Endothelialisierungsvorgängen der Rattenherz *dECM* mit insgesamt $n = 20$, konnten 6 *dECM*-Herzen in die Kontrollgruppe ohne *TNF- α* -Stimulation aufgenommen werden. In die Experimentalgruppe oder Stimulationsgruppe konnten 9 Herzen aufgenommen werden. Da eine absolute Menge an RNA von 35 ng angestrebt wurde, diese aber nicht von allen Proben erreicht werden konnte, wurde stattdessen die maximale verfügbare Menge eingesetzt.

4.1.3.1 Evaluation der relativen Genexpression nach *TNF- α* -Stimulation

Im Folgenden wird die relative Änderung der Genexpression der zuvor beschriebenen Zielgene im Einzelnen evaluiert. Anhand der Positiv-Kontrolle (2-D-Modell) lässt sich die „physiologische“ stimulierende Wirkung des *TNF- α* auf *HUVECs* in Zellkultur mit der Wirkung im *Tissue-Flap*-Modell (3-D-Modell) vergleichen.

4.1.3.1.1 Thrombomodulin (THBD)

Für das Zielgen THBD konnten $n = 3$ Proben in der Kontrollgruppe und $n = 3$ in der Stimulationsgruppe der Zellkulturkontrolle verwertet werden. Die ausgewerteten relativen Änderungen der Genexpression zeigten ein Mittel der Kontrolle von $1,269 \pm 0,1766$ (SEM) versus $0,054 \pm 0,006$ (SEM) in der Stimulationsgruppe. Damit zeigte sich eine signifikante Verringerung ($P=0,0023$) der Genexpression in der Stimulationsgruppe (siehe **Abb. 25**).

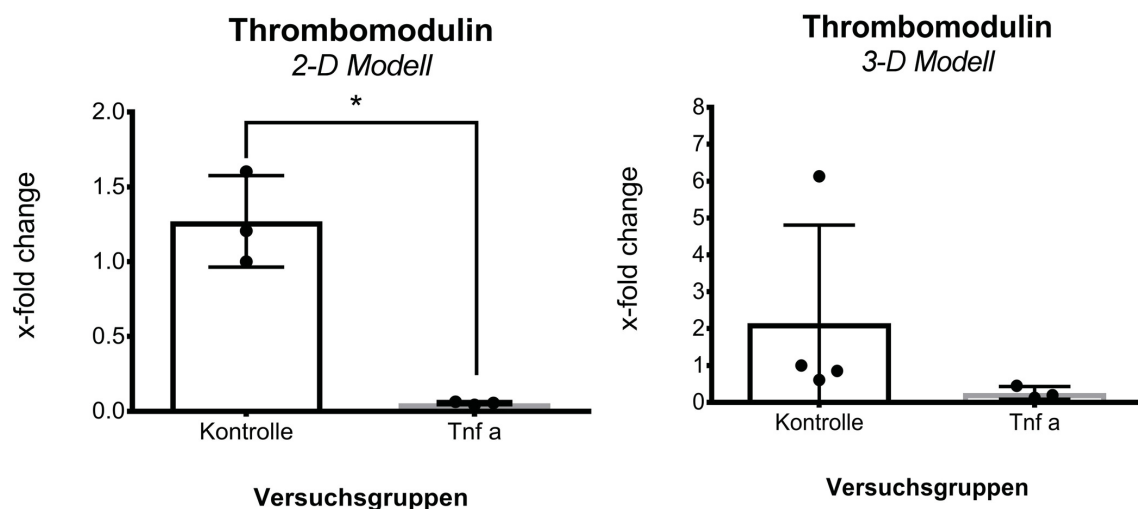


Abb. 25: Relative Genexpression von Thrombomodulin

HUVECs im 2D- und 3D-Modell; signifikante Verringerung der Genexpression im 2D-Modell (* $p < 0.05$).

x-Achse: Vergleich Kontrollgruppe und *TNF- α* -Stimulationsgruppe.

y-Achse: Auftrag der relativen Genexpression des Zielgens gegenüber dem Haushaltsgen der Kontrollgruppe und Stimulationsgruppe, Punkte = Einzelwerte, Balken = Mittelwerte, Fehlerbalken = $\pm$ SEM.

Bei der *Tissue-Flap-Model*-Gruppe wurden $n = 4$ Proben der Stimulationsgruppe und $n = 3$ Proben der Kontrollgruppe ausgewertet. Hier zeigt sich eine nicht signifikante Verringerung der Genexpression von THBD in der Stimulationsgruppe. Bei einem ausgewerteten Mittelwert der Kontrollgruppe von $2,147 \pm 1,329$ (SEM) versus $0,257 \pm 0,099$ (SEM) in der *TNF- α* -Gruppe.

4.1.3.1.2 Tissue Factor

Für das Zielgen *Tissue Factor* wurden $n = 3$ Proben für die Kontrollgruppe und $n = 3$ in der Stimulationsgruppe, der in der Zellkulturkontrolle stimulierten *HUVECs* ausgewertet. Die relative Genexpression war in der Stimulationsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($0,537 \pm 0,24$ (SEM) versus $4,035 \pm 0,513$ (SEM), $p < 0,0035$).

Im *Tissue-Flap*-Modell wurden für die Kontrolle $n = 3$ Proben mit einem Mittelwert von $3,25 \pm 2,27$ (SEM) versus $n = 5$ mit einem Mittelwert von $11,63 \pm 3,50$ (SEM) in der stimulierten Gruppe ausgewertet. Eine statistisch signifikant erhöhte Genexpression ergab sich hieraus nicht.

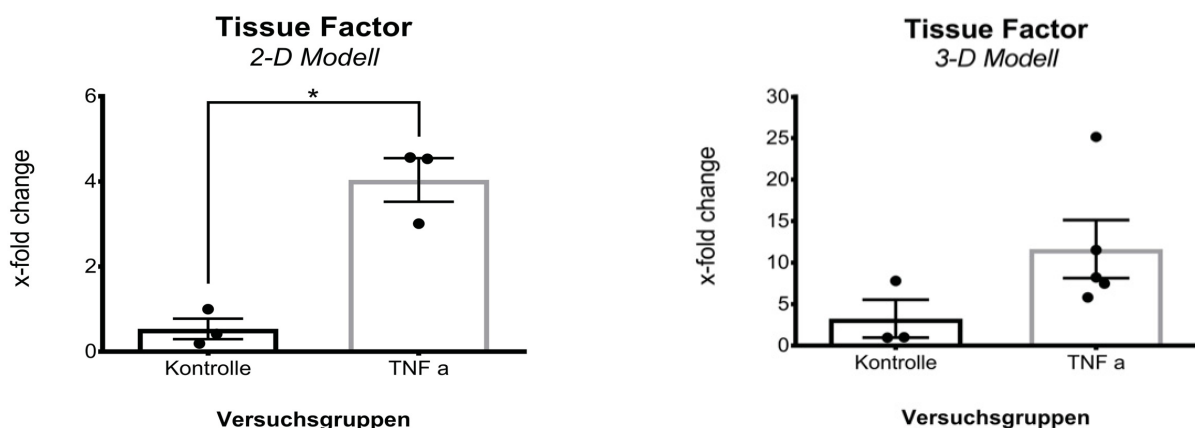


Abb. 26: Relative Genexpression von Tissue Factor

HUVECs im 2D- und 3D-Modell; signifikante Steigerung der Genexpression im 2D-Modell (* $p < 0.05$).

x-Achse: Vergleich Kontrollgruppe und *TNF- α* -Stimulationsgruppe.

y-Achse: Auftrag der relativen Genexpression des Zielgens gegenüber dem Haushaltsgen der Kontrollgruppe und Stimulationsgruppe, Punkte = Einzelwerte, Balken = Mittelwerte, Fehlerbalken = $\pm$ SEM.

4.1.3.1.3 ICAM-1

Für die Untersuchung der relativen Genexpressionsänderung im ICAM-1-Gen innerhalb der Zellkulturkontrolle wurden $n = 3$ Kontrollproben und $n = 3$ mit *TNF- α* stimulierte Proben untersucht und ausgewertet. Die relative Genexpression war in der Stimulationsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($3,84 \pm 2,01$ (SEM) versus $1281 \pm 186,4$ (SEM), $p = 0,0024$).

Die Auswertung der *Tissue Flap*-Gruppe mit $n = 3$ in der Kontrollgruppe und $n = 6$ in der Stimulationsgruppe ergab ebenfalls eine signifikant erhöhte Genexpression ($1,66 \pm 0,43$ (SEM) versus $140,4 \pm 26,86$ (SEM), $p = 0,0095$) (siehe **Abb. 27**).

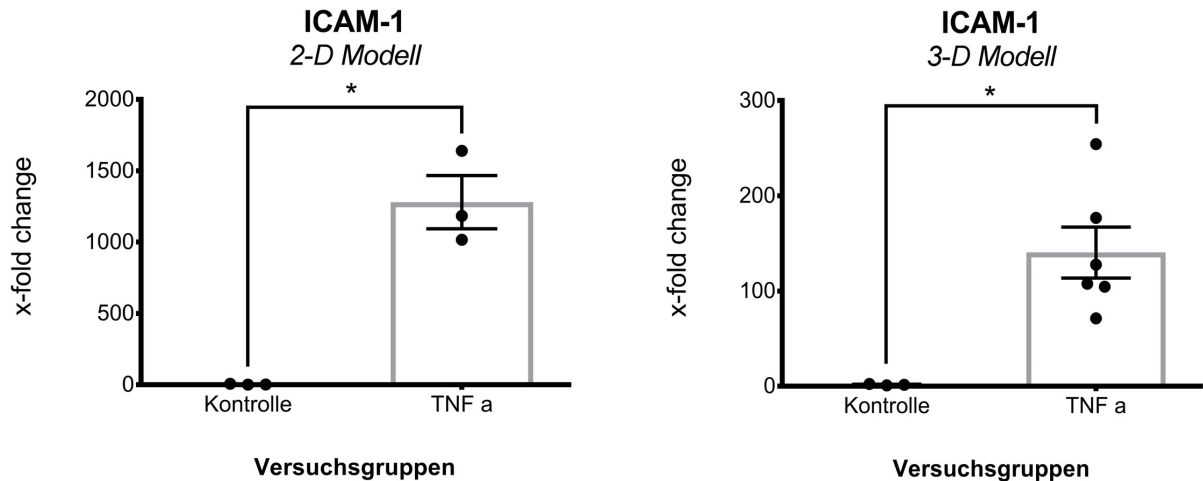


Abb. 27: Relative Genexpression von ICAM-1

HUVECs im 2D- und 3D-Modell; signifikante Hochregulation der Genexpression im 2D- (* $p < 0.01$) und 3D-Modell (* $p < 0.01$); x-Achse: Vergleich Kontrollgruppe und *TNF- α* -Stimulationsgruppe, y-Achse: Auftrag der relativen Genexpression des Zielgens gegenüber dem Haushaltsgen der Kontrollgruppe und Stimulationsgruppe, Punkte = Einzelwerte, Balken = Mittelwerte, Fehlerbalken = $\pm$ SEM.

4.1.3.1.4 E-Selectin

Bei der Untersuchung der Expression des SELE-Gens der Zellkulturkontrolle wurden je $n = 3$ Proben für Kontrolle und Stimulationsgruppe untersucht. Die relative Genexpression in der Stimulationsgruppe war auch hier im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($0,622 \pm 0,20$ (SEM) versus $354,5 \pm 39,61$ (SEM), $p = 0,0009$) (siehe **Abb. 28**).

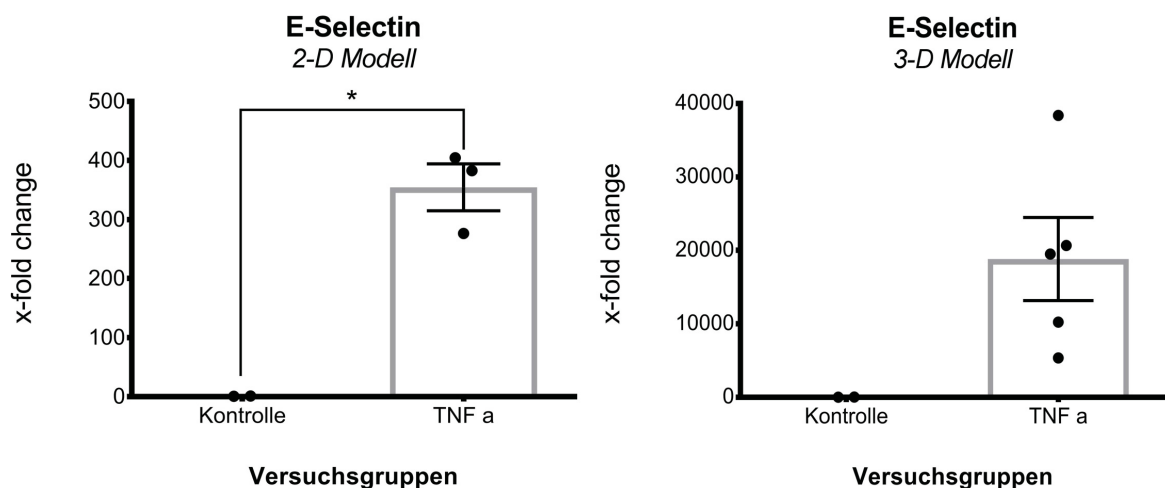


Abb. 28: Relative Genexpression von E-Selectin

HUVECs im 2D- und 3D-Modell; signifikante Steigerung der Genexpression im 2D-Modell (* $p < 0.01$). x-Achse: Vergleich Kontrollgruppe und *TNF- α* -Stimulationsgruppe. y-Achse: Auftrag der relativen Genexpression des Zielgens gegenüber dem Haushaltsgen der Kontrollgruppe und Stimulationsgruppe, Punkte = Einzelwerte, Balken = Mittelwerte, Fehlerbalken = $\pm$ SEM.

Im *Tissue Flap*-Stimulationsversuch wurden $n = 2$ Proben der Kontrolle zugeordnet sowie $n = 5$ Werte für die Stimulationsgruppe inkludiert. Die Stimulationsgruppe zeigte eine deutliche Hochregulation von E-Selectin im Vergleich zur Kontrolle, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen ($10,33 \pm 9,33$ (SEM) versus 18821 ± 5661 (SEM)).

4.1.3.1.5 VCAM-1

Für VCAM-1 konnten in der Zellkulturkontrollgruppe $n = 2$ Proben verwertet werden, eine Probe bot trotz guter RNA-Qualität und Quantität keine ausreichende Genexpression, um sicher inkludiert werden zu können. In der Stimulationsgruppe konnte die Gesamtzahl von $n = 3$ untersucht werden. Die relative Genexpression war dabei in der Stimulationsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($0,63 \pm 0,37$ (SEM) versus $407 \pm 42,71$ (SEM), $p = 0,0052$).

Für die Versuchsreihe im *Tissue-Flap*-Modell konnten keine ausreichenden Mengen an VCAM-1 innerhalb der Kontrolle nachgewiesen werden. Somit war es trotz gemessener Aktivität in der Stimulationsgruppe, aufgrund mangelnder Kontrollwerte nicht möglich, eine relative Genexpression von VCAM-1 zu evaluieren (siehe **Abb. 29**).

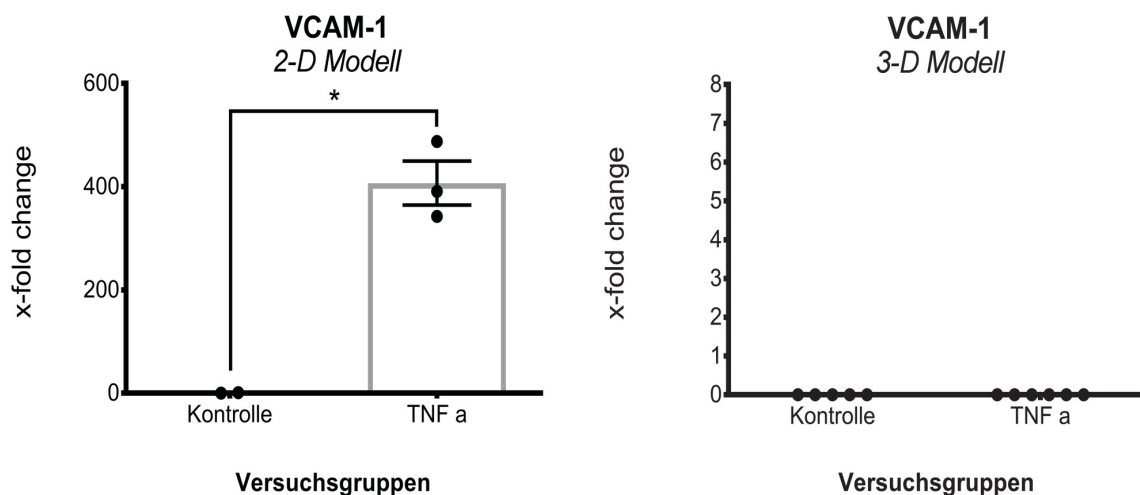


Abb. 29: Relative Genexpression von VCAM-1

HUVECs im 2D- und 3D-Modell; signifikante Hochregulation der Genexpression im 2D-Modell (* $p < 0.01$).

x-Achse: Vergleich Kontrollgruppe und *TNF-α*-Stimulationsgruppe.

y-Achse: Auftrag der relativen Genexpression des Zielgens gegenüber dem Haushaltsgen der Kontrollgruppe und Stimulationsgruppe, Punkte = Einzelwerte, Balken = Mittelwerte, Fehlerbalken = $\pm$ SEM.

4.2 Oberflächenfunktionalisierung von dezellularisierter kardialer EZM

4.2.1 Vorversuche zur Auswahl der optimalen Zellkonzentration

Um die optimale Konzentration an Zellen für die Adhäsionsstudie herauszufinden, wurden die nach Standardprotokoll dezellularisierten und nicht beschichteten Pulmonalklappensegel mit einer ansteigenden *HUVEC*-Zellkonzentration 4 h lang inkubiert. Dabei wurden Konzentrationen von 2×10^5 , 3×10^5 und 4×10^5 Zellen/ml Zellmedium getestet. Nach Auswertung der einzelnen Kulturkammern wurde eine Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml für die anstehenden Versuche ausgewählt. Diese Konzentration bot eine Konfluenz von optischen 70-80 % der Segeloberfläche und bot somit eine gute Diskriminationsfähigkeit bezüglich der Unterschiede in der Zelladhäsion im Beschichtungsversuch.

4.2.2 Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung mittels fluoreszenzmarkierter Peptide

Durch die Kopplung der Peptide mit dem fluoreszierenden Farbstoff Carboxyfluorescein wurde eine erfolgreiche Biofunktionalisierung der *dECM* im verwendeten Protokoll nachgewiesen. **Abb. 30** zeigt den Nachweis des Fluoreszenzsignals der beschichteten Struktur. Dabei handelt es sich um eine der standardisiert dezellularisierten und präparierten Pulmonalklappensegel, wie sie für sämtliche Versuche verwendet wurden. Als Kontrolle diente eines der Segel, welches mit einem nicht fluoreszierenden Peptid (RGD Motiv) beschichtet wurde.

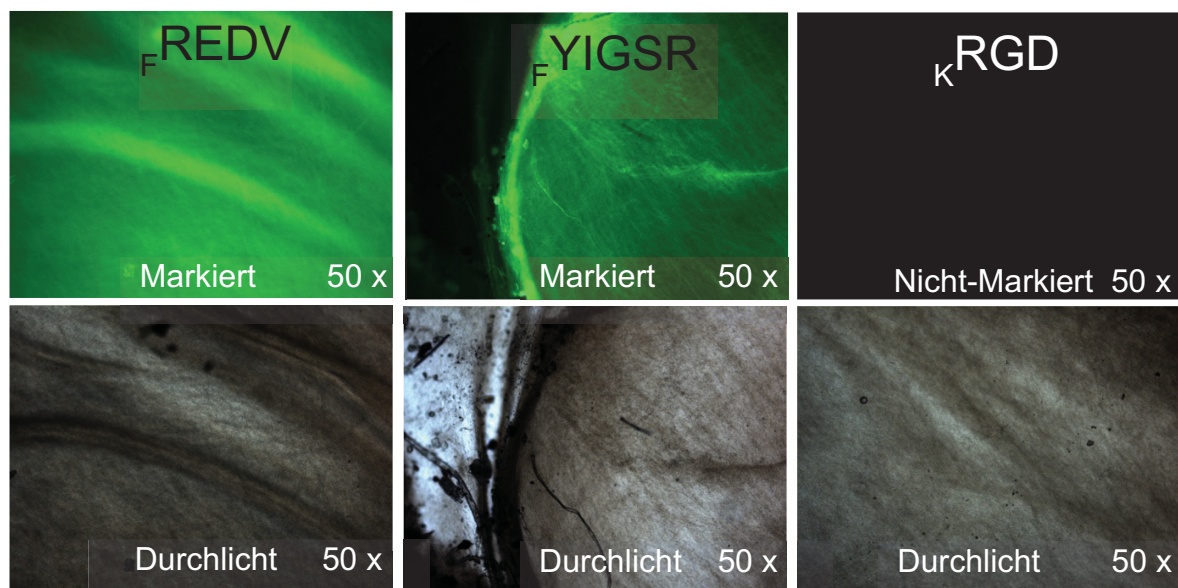


Abb. 30: Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung durch Fluoreszenzmarkierung der Peptidbeschichtung von ovinen Pulmonalklappensegel *dECM*

Fluoreszenzmarkierte Peptide REDV und YIGSR als Nachweis einer erfolgreichen Beschichtung mit dazugehörigen Durchlichtaufnahmen, das Peptid RGD ohne Fluoreszenzmarkierung diente als Kontrolle.

Die verwendeten repräsentativen Beispielbilder wurden mit den fluoreszenzmarkierten Peptidmotiven REDV und YIGSR aufgenommen. Die jeweils unterhalb platzierten Bilder zeigen die entsprechenden reinen Durchlichtaufnahmen, um die Position der Fluoreszenzaufnahme zu verifizieren.

4.2.3 *In vitro*-Zell-Adhäsion

4.2.3.1 Einzel- und Doppelfunktionalisierung

Die Messung der Zelladhäsion fand jeweils 1 h und 4 h nach Zellbesiedlung mit *HUVECs* statt. Untersucht wurden die folgenden Peptide und Peptidkombinationen mit den entsprechenden Zelladhäsionsmotiven: RGD, REDV, YIGSR und die Kombinationen RGD/REDV, RGD/YIGSR.

Eine Übersicht über die *Total Area occupied by Cells (TAoC)* der 1 h- und 4 h-Versuchsgruppen ist in **Tabelle 9** und **Tabelle 10** dargestellt.

Die Biofunktionalisierung der einzelnen Peptide konnte dabei nach 1 h Besiedlungszeit für RGD, REDV und YIGSR keine statistisch signifikant höhere oder geringere Zelladhäsion nach *HUVEC*-Besiedlung gegenüber der nicht funktionalisierten Kontrollgruppe erreichen. RGD und YIGSR boten bei einem MW von 17,51 % und 16,06 % im Gegensatz zu 18,52 % in der Kontrolle eine geringere *TAoC*. Lediglich REDV konnte eine im MW leichte Steigerung der Adhäsion von 19,295 % gegenüber 18,515 % in der Kontrollgruppe erreichen.

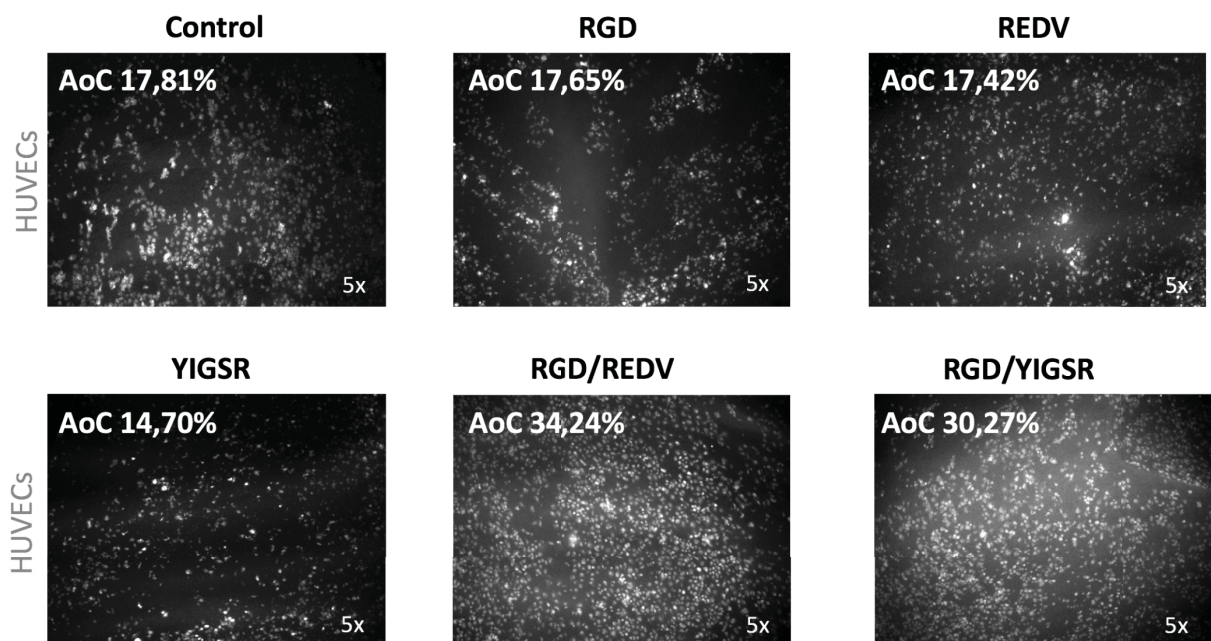


Abb. 31: Direkter Vergleich der AoC nach 1 h Besiedlungszeit

Repräsentative Aufnahmen der *in vitro* Zelladhäsionsstudie anhand oviner Pulmonalklappensegel *dECM* nach Biofunktionalisierung in Einzel- und Doppelfunktionalisierung sowie Besiedlung mit *HUVECs*, Mittelwerte *Area occupied by Cells (AoC)* in %, Vergrößerung 50 x (5 x 10).

REDV bot dabei jedoch die höchste Standardabweichung der 1 h Besiedlungskohorte mit SD 11,539. Die niedrigsten Abweichungen zeigten die mittels RGD funktionalisierten Segel bei SD 0,293 sowie die Kontrollgruppe mit SD 5,230.

Die kombinierten Funktionalisierungsgruppen RGD/REDV und RGD/YIGSR kamen nach 1 h Besiedlungszeit im direkten Vergleich auf höhere *TAoC*-Werte. Eine statistische Signifikanz konnte hier jedoch ebenfalls nicht nachgewiesen werden. RGD/YIGSR konnte dabei mit einem MW von 34,128 % und RGD/REDV mit einem MW von 31,853 % bessere Adhäsionswerte als die Kontrolle und die Einzelfunktionalisierung erzielen. Bei genauerer Betrachtung ist dies bereits visuell anhand der repräsentativen Bilder in **Abb. 31** erkennbar.

1 h	Kontrolle	RGD	REDV	YIGSR	RGD/REDV	RGD/YIGSR
n1	20,96	17,17	31,16	13,79	43,53	36,86
n2	12,51	17,66	8,11	10,03	29,88	42,63
n3	22,08	17,70	18,62	24,35	22,14	22,90
MW	18,52	17,51	19,30	16,06	31,85	34,13
SD	5,23	0,29	11,54	7,43	10,83	10,14
p	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse des *in vitro* Zelladhäsionsversuch nach 1 h Besiedlungszeit
Area occupied by Cells (AoC) für n1-n3 der Kontrolle und der einzelnen Versuchsgruppen, Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), p-Wert (p), n.s. = nicht statistisch signifikant

In der Versuchsgruppe mit einer Besiedlungszeit von 4 h erkennt man in allen Funktionalisierungsgruppen und der Kontrolle bereits höhere *TAoC*-Werte im Gegensatz zum 1 h-Versuch. Repräsentative Aufnahmen sowie die unmittelbar zugehörige *TAoC* in Prozent zeigen die **Abb. 31** und **32**. Die Kontrollgruppe ohne funktionalisierte Segel erreichte den niedrigsten *TAoC*-Wert mit 24,34 % und wurde somit von allen funktionalisierten Gruppen übertroffen. Die höchsten *TAoC*-Werte erreichten in der 4 h-Gruppe analog zum 1 h-Versuch die kombiniert eingesetzten Peptide RGD/YIGSR und RGD/REDV mit MW 32,50 % und MW 42,46 % ($p < 0.05$). Die Oberflächenfunktionalisierung mittels RGD/REDV erreichte dabei mit 4 h Besiedlungszeit eine signifikant höhere *TAoC* als die entsprechende Kontrollgruppe. Betrachtet man die Funktionalisierung mit Einzelpeptiden, finden sich im 4 h Zeitfenster eine umgekehrte Reihenfolge der im 1 h Versuch erreichten Mittelwerte. Das REDV Peptid erzielte mit MW 19,295 % im 1 h Intervall den besten Wert der Einzelpeptidbeschichtung, nach 4 h betrug die Steigerung der *TAoC* lediglich 26,17 % und lag somit unter denen der RGD- (29,15 %) und

YIGSR- (28,39 %)-Beschichtung. Die veranschaulichten Ergebnisse beider Versuchsgruppen zeigen die **Tabellen 9 und 10**. Zusammenfassend erreichten die singulären Peptidfunktionalisierungen in beiden Besiedlungszeiten nach 1 h und 4 h keine signifikant erhöhte *TAoC*. In den Versuchsgruppen mit Einsatz der Peptidkombinationen verstärkte sich der Trend der vermehrten Adhäsion sowohl beim Zeitpunkt von 1 h als auch 4 h und erreichte zum 4 h Zeitpunkt eine statistisch signifikante Steigerung der *TAoC* in der kombinierten Gruppe RGD/REDV. Eine grafische Darstellung aller Versuchsgruppen zeigt **Abb. 33**. Veranschaulicht wird die *TAoC*, als auch die x-fache Zunahme der *TAoC* im Vergleich mit der Kontrollgruppe nach 1 h und 4 h.

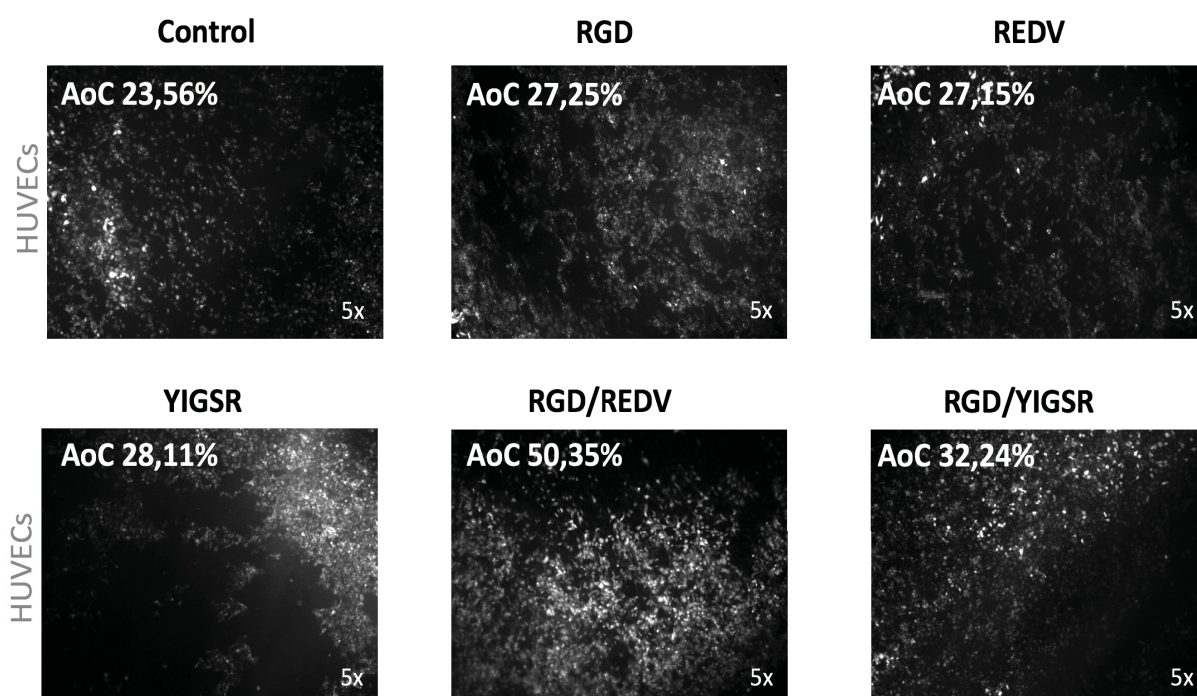


Abb. 32: Direkter Vergleich der AoC nach 4 h Besiedlungszeit

Repräsentative Aufnahmen der *in vitro* Zelladhäsionsstudie anhand oviner Pulmonalklappensegel *dECM* nach Biofunktionalisierung in Einzel- und Doppelfunktionalisierung und Besiedlung mit HUVECs, Mittelwerte *Area occupied by Cells* (AoC) in %, Vergrößerung 50 x (5 x 10)

4 h	Kontrolle	RGD	REDV	YIGSR	RGD/REDV	RGD/YIGSR
n1	27,40	29,53	32,91	33,38	44,24	40,42
n2	16,77	29,21	21,31	29,19	38,29	24,76
n3	28,86	28,72	24,29	22,40	44,95	32,33
MW	24,34	29,15	26,17	28,39	42,46	32,50
SD	6,60	0,41	6,03	5,56	3,71	7,84
p	-	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,05	n.s.

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse des *in vitro* Zelladhäsionsversuch nach 4 h Besiedlungszeit
Area occupied by Cells (AoC) für n1-n3 der Kontrolle und der einzelnen Versuchsgruppen, Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), p-Wert (p), n.s. = nicht statistisch signifikant

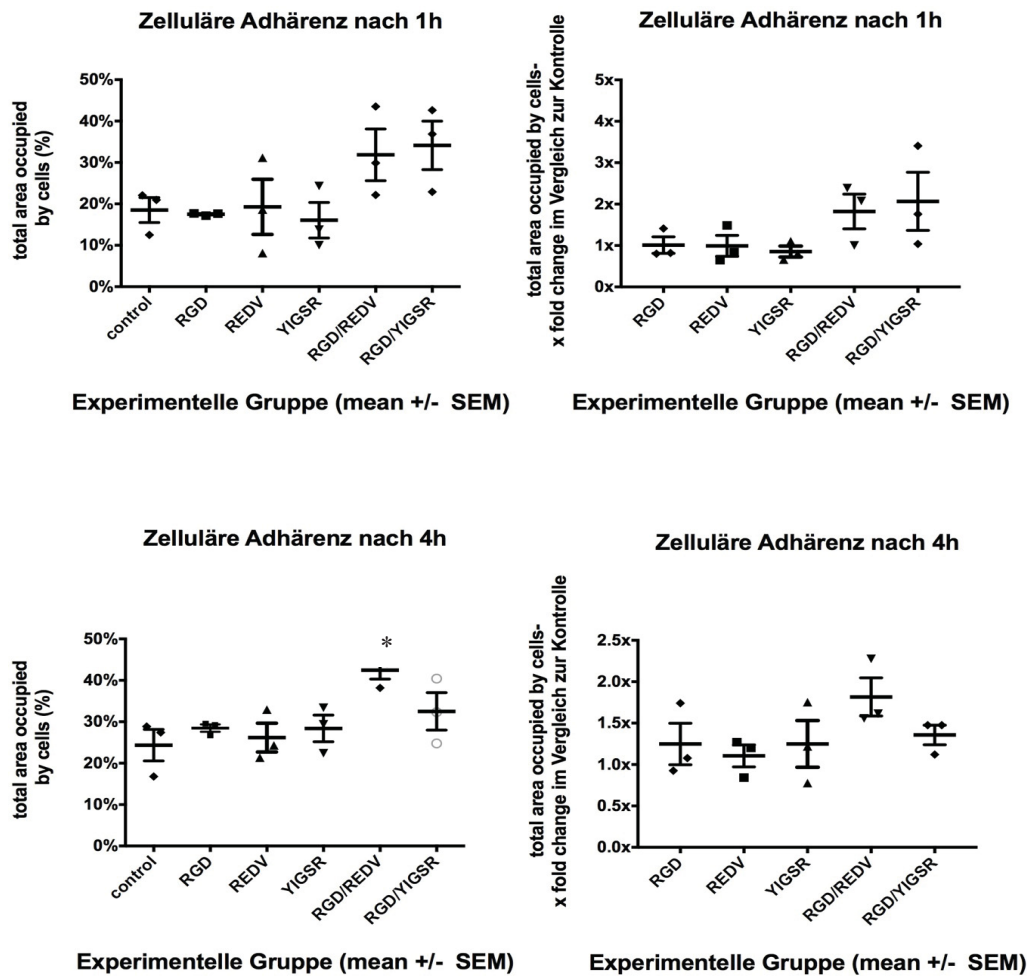


Abb. 33: Zelladhäsionsstudie nach Oberflächenfunktionalisierung von ovinen Pulmonalklappen *dECM*
 Zelluläre Adhärenz nach 1 h und 4 h mit Darstellung der TAOc und x-fache Zunahme gegenüber der Kontrolle; Symbole = Einzelwerte, Balken = Mittelwerte und +/- SEM, * = statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

4.3 Herstellung von *human-size dECM*-Gerüsten

Das übergeordnete Ziel des *Tissue Engineering* im Allgemeinen und speziell im Bereich des kardiovaskulären *Tissue Engineering* ist es eine klinische Anwendbarkeit der erzeugten Konstrukte zu etablieren. Um dies zu erreichen ist es essenziell *dECM*-Konstrukte mit humanen Dimensionen zu entwickeln. Um die benötigten Größenverhältnisse zu erzielen, wurde innerhalb dieser Arbeit die Möglichkeit der perfusionsbasierten *in toto* Dezellularisierung von ovinen Herzen anhand der Modifizierung einer bereits etablierten Kleintierherz-Dezellularisierung untersucht.

4.3.1 Modifizierung eines etablierten Protokolls zur Kleintierherz-Dezellularisierung für die *in toto* Dezellularisierung von ovinen Herzen

Um die qualitativ guten Ergebnisse der bereits etablierten und ebenfalls in dieser Arbeit genutzten Rattenherz-Dezellularisierung auf humane Dimensionen zu übertragen, mussten einige Än-

derungen am verwendeten Protokoll durchgeführt werden. Das Grundprinzip der perfusionsbasierten *in toto* Dezellularisierung wurde jedoch weiterverfolgt.

Um den veränderten Größenverhältnissen gerecht zu werden, war es notwendig, die automatisierte softwaregesteuerte Dezellularisierungsanlage mit größeren Reaktionsgefäßen auszustatten und für die Aufnahme und Verarbeitung größerer Perfusionsvolumina anzupassen. Die im Kleintiermodell suffiziente retrograde Perfusion über die Aorta ascendens konnte dabei nicht eins zu eins übertragen werden, entsprechende Versuche mit geeigneten Schlauchsystemen erbrachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse der Dezellularisierungsqualität. Zur Aufrechterhaltung entsprechender Perfusionsdrücke und zur Steigerung der selektiven Perfusion des Koronarsystems folgte die Anpassung hin zur selektiven Kannülierung der Koronarostien. Hiermit konnte die Qualität der Dezellularisierung gesteigert und synergistisch der Leckage bedingte Ausschuss von Perfusionslösung gesenkt werden. Im letzten Schritt der Anpassung wurden verschiedenste Modifikationen des bereits etablierten Perfusionsprotokolls getestet und zunächst auf ihren makroskopischen und in einem weiteren Schritt auf den mikroskopischen Dezellularisierungseffekt untersucht. Dabei wurden verschiedene Kombinationen der Gefäßperfusion mit definierten Mengen an Detergenzien variiert. Untersucht wurden der einmalige Gefäßdurchlauf einer definierten Menge an Perfusat einerseits und die Gefäßperfusion durch ein definiertes Volumen in ständiger Rückführung mit resultierendem mehrfachem Gefäßdurchlauf andererseits. Ebenfalls kombiniert wurden wiederkehrende Spülschritte durch Wasser in dieser Weise.

4.3.2 Etablierungsphase und Protokoll-Validierung mittels makroskopischer und mikroskopischer Evaluation der Dezellularisierungsqualität

In der Etablierungsphase wurden die unterschiedlichen vorgenommenen Modifikationen hinsichtlich der erzielten makro- und mikroskopischen Dezellularisierungsqualität hin untersucht. Dabei zeigten sich grob unterteilt zwei Formen der unzureichenden Dezellularisierung. Erstere waren bereits makroskopisch als solche zu erkennen und sind im Rahmen eines typischen Dezellularisierungsvorgangs in **Abb. 34** dargestellt.

Entsprechende makroskopisch nicht vollständig dezellularisierte Herzen, wie im Beispiel zu sehen, ergeben Hinweise auf eine Minderperfusion des entsprechenden Gewebes, z.B. durch postmortale Thrombusbildung.

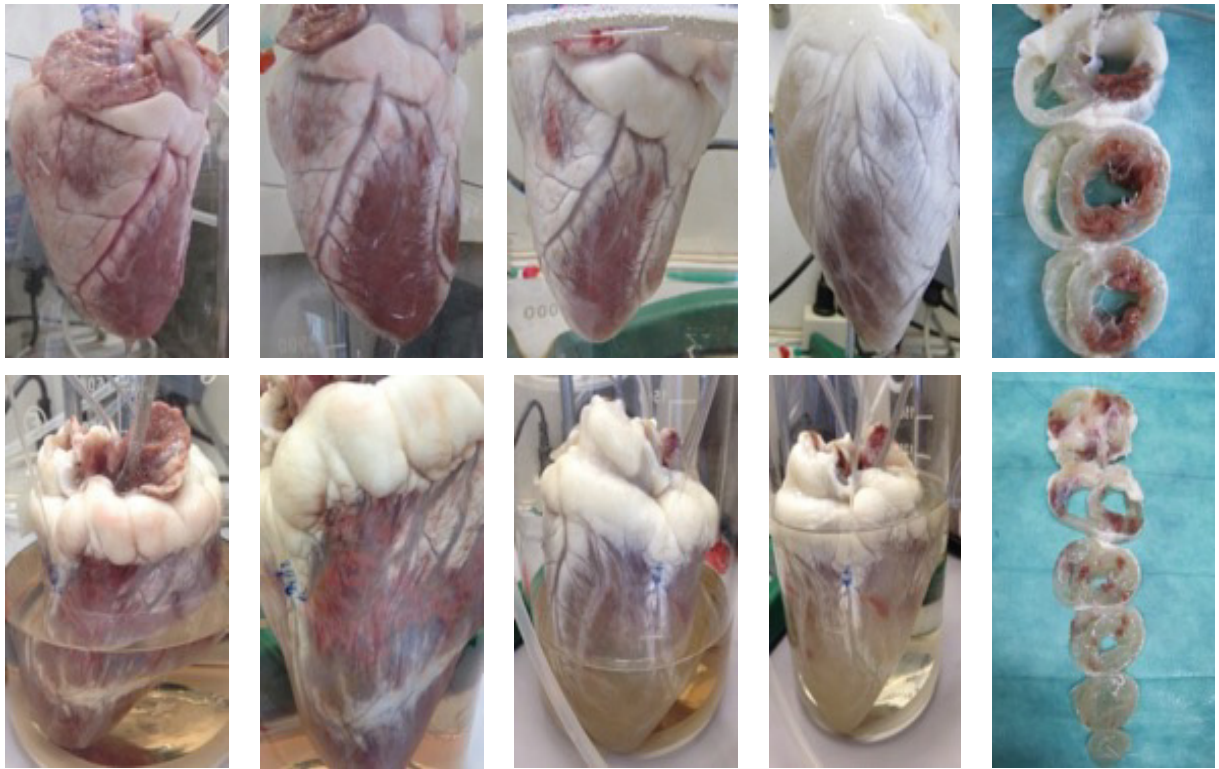


Abb. 34: Repräsentative Aufnahmen ovines Herz während eines inkompletten *in toto* Dezellularisierungsversuchs

Chronologische Reihenfolge von links oben – rechts unten mit verschiedenen Stadien einer inkompletten perfusionsbasierten *in toto* Dezellularisierung, rechter Bildrand = transversale Schichten des ovinen Herz – nach Beenden des Vorgangs mit makroskopischen myokardialen Resten in inselartiger Verteilung.

Mit einer Diskrepanz zwischen makroskopisch vollständig transparent erscheinenden Arealen und simultan auftretenden nahezu vollständig unbeeinflussten Arealen ohne sichtbaren Dezellularisierungserfolg. Die zweite Gruppe der makroskopisch myoglobinfreien Herzen wurde der folgenden weiteren histologischen Beurteilung zugeführt.

Die Bilderreihen der **Abb. 35** zeigen mit DAPI-gefärbte Fluoreszenzaufnahmen. Es handelt sich dabei um histologische Schnitte nicht dezellularisierter nativer Schafsherzen zur Veranschaulichung der physiologischen Konfiguration der Zellkerne an epikardialer, endokardialer und myokardialer Stelle im Gegensatz zur ovinen *dECM*. Zu sehen sind ein ausgeprägter Fettkranz epikardial, mit typischen Fettzellen. Im myokardialen Abschnitt zeigen sich zahlreiche Zellkerne mit dazugehörigen Zellen, welche im Durchlichtbild bräunlich erscheinen. In der letzten Aufnahmereihe erkennt man die native Zell- und Zellkernkonfiguration in einem Gefäß auf endokardialer Seite. Das dargestellte Gefäß liegt eingebettet und umgeben von Fettzellen.

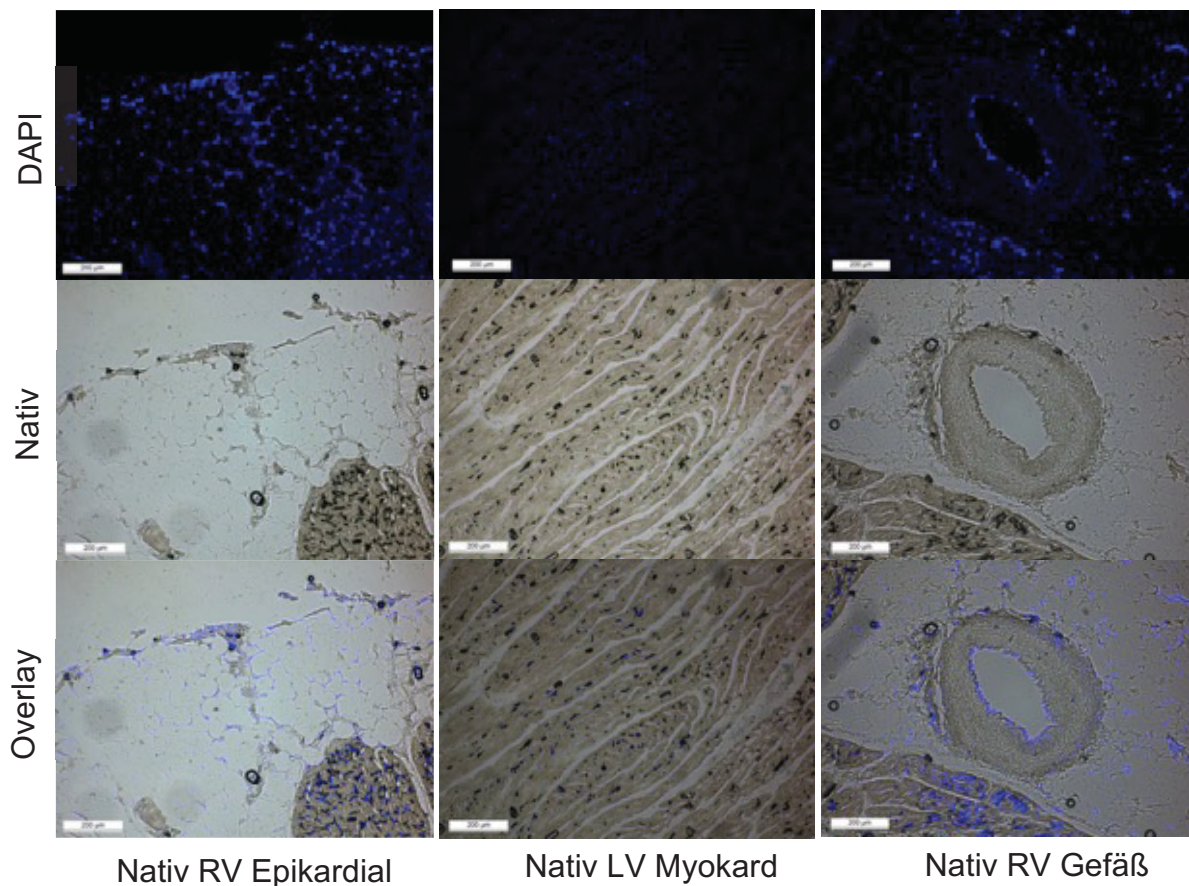


Abb. 35: Repräsentative Aufnahmen natives ovines Herz nach DAPI-Färbung

Histologische epikardiale, myokardiale Schnitte und Gefäßdarstellung natives ovines Herz nach DAPI-Färbung zur Veranschaulichung der natürlichen Morphologie und zellulären Verteilung; DAPI-Signal, Nativbild und Overlayaufnahmen (Maßstab 200 µm (100 x)).

Die Bilderreihe der **Abb. 36** zeigt nun im Vergleich eine repräsentative Auswahl an Aufnahmen von dezellularisierten, makroskopisch zellfreien Herzen aus weiter fortgeschrittenen Etablierungsprotokollen. Die histologische Aufarbeitung lässt erkennen, dass zelluläre beziehungsweise nucleinsäurehaltige Rückstände ohne intakte Zell- oder Zellkernstruktur sichtbar bleiben. Auffälliger Weise scheinen hier die zellulären Rückstände besonders in der Nähe von Gefäßen zu akkumulieren, ein entsprechendes Beispiel zeigt die myokardiale Bildserie in **Abb. 36**. Durch weitere histologische Standardfärbungen wie H.E.- (**Abb. 37**) oder MOVAT-Färbung (**Abb. 38**) erfolgte die Evaluation der EZM-Integrität und Zusammensetzung sowie erneut der Kontrolle der Zellfreiheit in bereits weiter fortgeschrittenen Dezellularisierungsprotokollen. Die wabenartig angeordnete Faserstruktur und die hell-rötliche Färbung zeigen kollagenreiche, extrazelluläre Komponenten. Die **Abb. 37a-f** mit Nativaufnahmen und Aufnahmen unvollständige dezellularisierter EZM dienen der besonderen Veranschaulichung der mikroskopischen Unterschiede einer dezellularisierten EZM gegenüber einer nativen EZM. Eine besondere Situation zeigt sich in **Abb. 37b**. Hier wurde die genaue Grenze zwischen dezellularisiertem und

weiterhin zellreichem Gewebe getroffen. Eine Übergangszone lässt sich nicht erkennen. Der Wechsel zwischen zellreichem und myoglobin-rot gefärbtem Areal und zellfreiem von Kollagen dominiertem Bereich erscheint abrupt und willkürlich. Die restlichen Abbildungen dieser Färbung entsprechen dem typischen dezellularisierten Typus und zeigen in diesen repräsentativen Aufnahmen keinerlei Anzeichen für Zellkerne oder verbleibenden nukleinsäurehaltigen Zelldetritus. Auffällig an **Abb. 38c** ist der prominente Fettkranz, der sich ohne den im Nativpräparat an den Rand gedrängten Zellkern, blasenartig epikardial an das Myokard aufsetzt. Die endokardiale Seite des Präparates ist dagegen durch eine regelrechte Verdichtung der Faserstruktur im Randbereich gekennzeichnet, was sich in einer intensiveren acidophilen Färbung ausdrückt. Die in **Abb. 38f** demonstrierten kardialen Gefäße weisen eine intakte Struktur auf und sind in eine zellrestfreie EZM eingebettet.

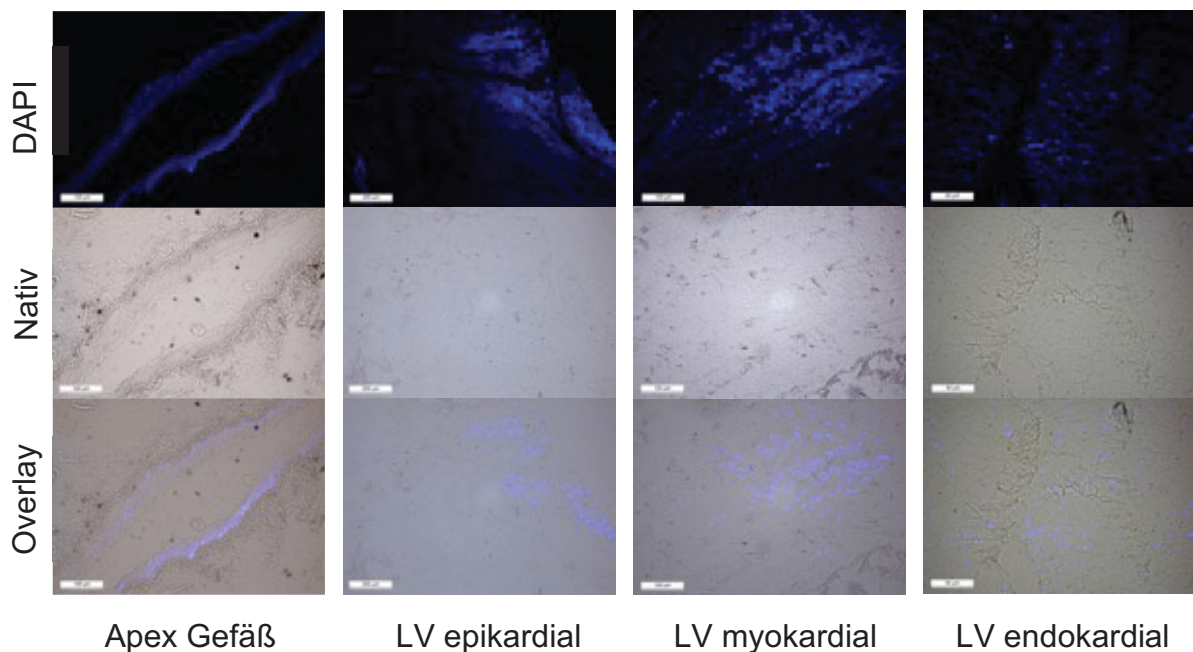


Abb. 36: Repräsentative Aufnahmen von Zellrückständen innerhalb der ovinen dECM mittels DAPI-Färbung
Aufnahmen von dezellularisierten, makroskopisch zellfreien ovinen Herzen aus weiter fortgeschrittenen Etablierungsprotokollen nach Probenentnahme aus epi-, myo- und endokardialen linken Ventrikel (LV) und DAPI-Färbung (6µm Paraffinschnitt); beispielhafte Verteilung von DNA-Rückständen in blauer Fluoreszenz ohne sichtbare intakte Zellkerne; DAPI-Signal, Nativbild und Overlayaufnahmen (Maßstab 200 µm (100 x)).

Die durchgeführte MOVAT-Färbung aus **Abb. 38** diente der genaueren Evaluation der vorherrschenden EZM-Komponenten nativer und dezellularisierter Proben im Vergleich. Ähnlich **Abb. 37a** zeigen die **Abb. 38a** und **b** das native Bild, eines undezellularisierten Schafsherzen in MOVAT-Färbung. Deutlich stechen die tiefrote Färbung der Myokardzellen und die zahlreichen Zellkerne der Kardiomyozyten hervor. In **Abb. 38a** ist zusätzlich ein mittelgroßes ca. 200 µm großes Gefäß zu erkennen. Dieses enthält zahlreiche Zellen und Zellkerne, welche die

dichte schwarze Tüpfelung in der Färbung ausmachen. Die restlichen gezeigten Abbildungen entstammen dezellularisierten Präparaten.

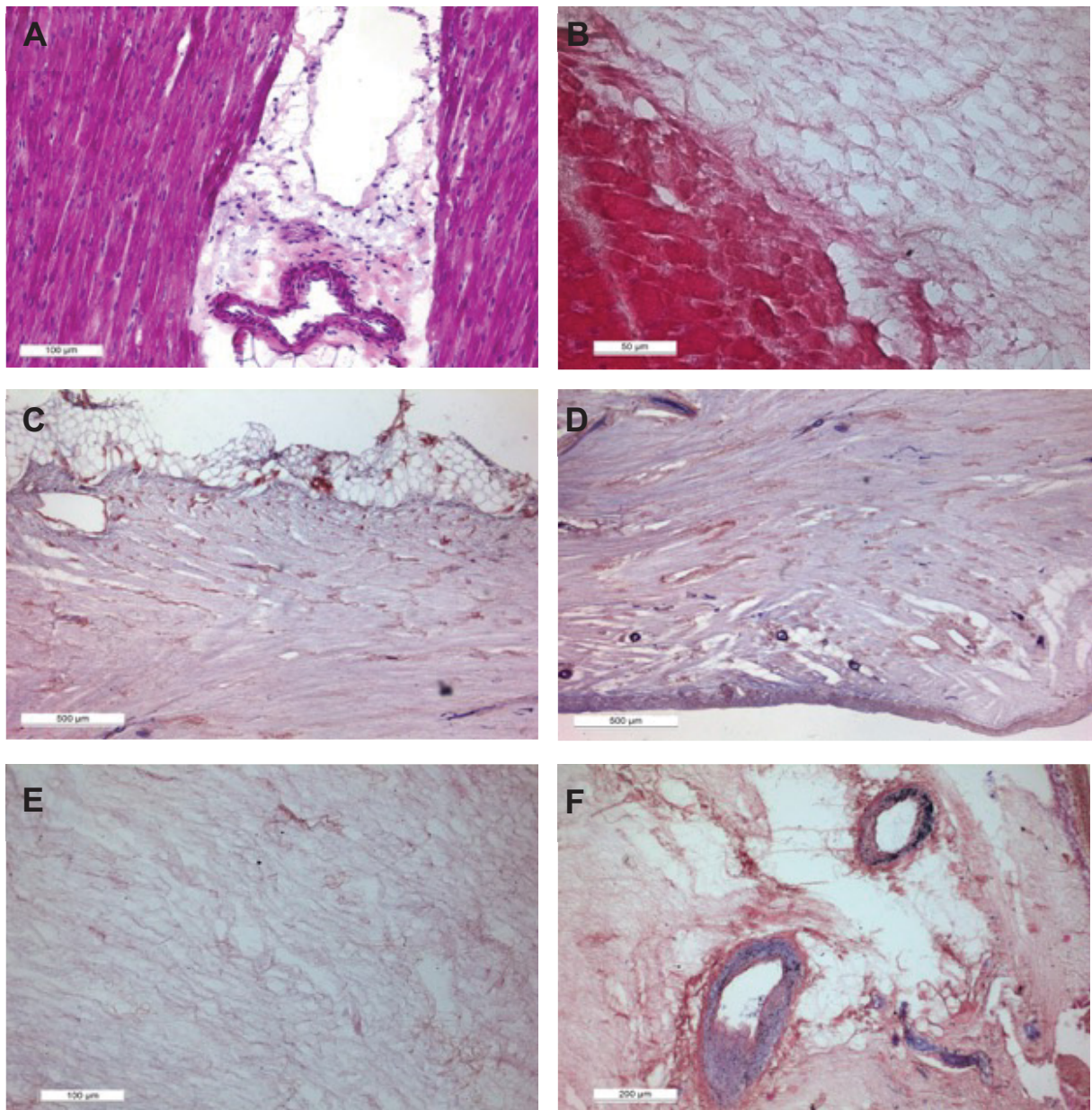


Abb. 37: Repräsentative Aufnahmen ovine *dECM* und Nativaufnahmen in H.E. Färbung

(A) Schafsherz nativ, Gefäß, Myokard (Maßstab 100 µm (200 x)); (B) linker Ventrikel sichtbare Dezellularisierungsgrenze in unvollständig dezell. Herz (Maßstab 100 µm (200 x)); (C) Schafsherz nativ, rechter Ventrikel, Epikard, Fettkranz, Myokard (Maßstab 500 µm (50 x)); (D) Schafsherz nativ, rechter Ventrikel, Endokard (Maßstab 500 µm (50 x)); (E) Schafsherz *dECM*, rechter Ventrikel, Myokard (Maßstab 100 µm (200 x)); (F) Schafsherz nativ, Herzseptum, Gefäßanschnitte im Myokard (Maßstab 200 µm (100 x)).

Gemein haben alle gefärbten Schnitte eine blaugrüne Grundfarbe, diese zeigt die extrazelluläre Grundsubstanz des Gewebes. Die Grundstruktur ist faserig angeordnet und von gelben Kollagenfasern durchzogen. Der Anteil der Kollagenfasern variiert innerhalb des Präparats als auch zwischen verschiedenen Herzen. Die **Abb. 38c** und **e** weisen auch einen gewissen Anteil an

rötlichen Einsprengungen auf, was analog zu **Abb. 36** auf minimale zelluläre Restsubstanz hindeutet. Obwohl es Anhaltspunkte für myokardiale Rückstände in diesen makroskopisch sehr gut dezellularisierten Gewebeproben gibt, konnten in keinem der Bilder intakte Zellen oder Zellkerne ermittelt werden.

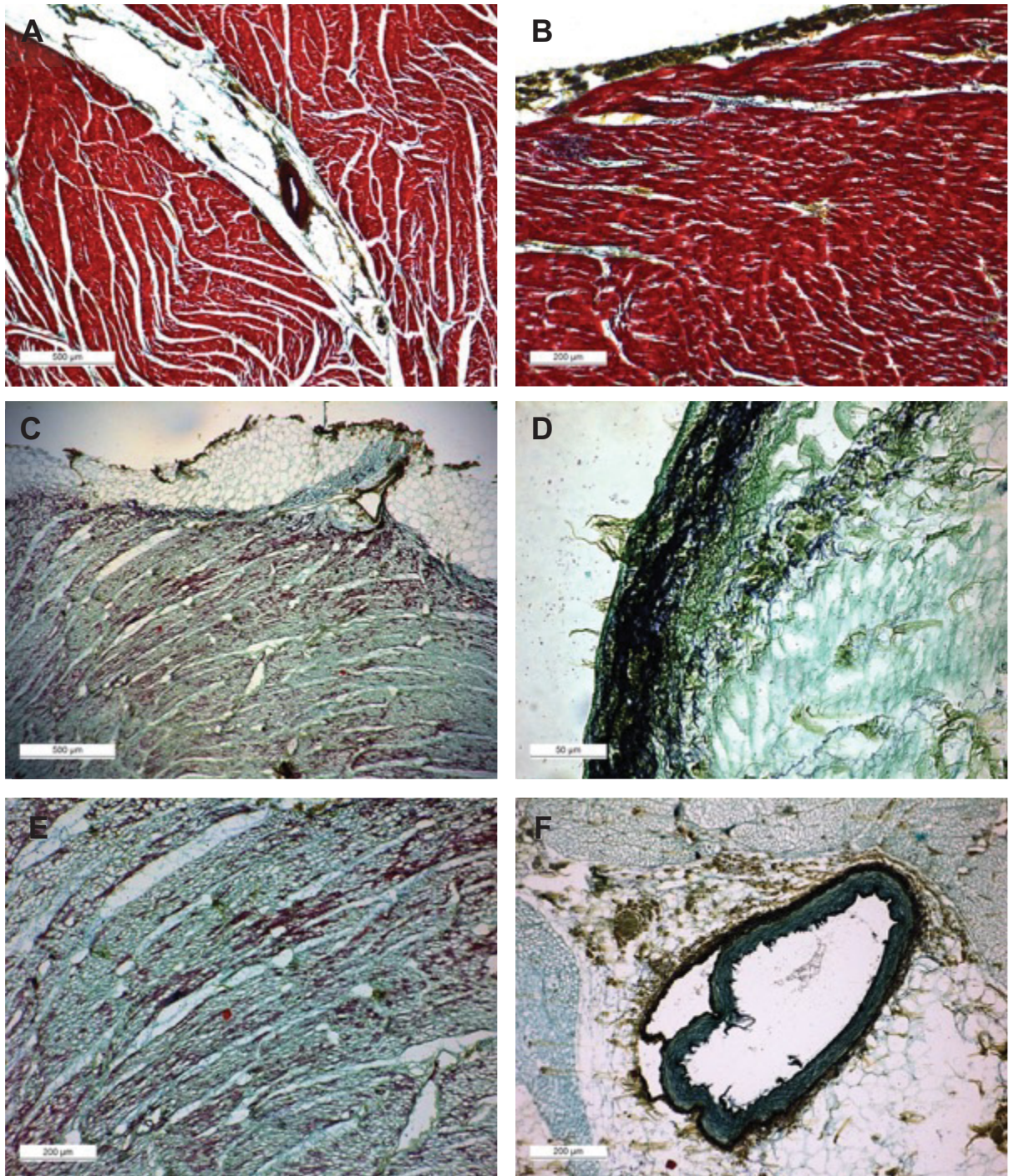


Abb. 38: Repräsentative Aufnahmen ovine dECM und Nativaufnahmen in MOVAT-Färbung

(A) Nativ, linker Ventrikel, Myokard (Maßstab 500 µm (50 x)); (B) Nativ, linker Ventrikel, Endokard (Maßstab 200 µm (100 x)); (C) dECM, linker Ventrikel, Epikard mit Fettkranz (Maßstab 500 µm (50 x)); (D) dECM, linker Ventrikel, Endokard (Maßstab 500 µm (50 x)); (E) dECM linker Ventrikel, Myokard; (Maßstab 200 µm (100 x)) f) dECM, linker Ventrikel, Gefäß (Maßstab 200 µm (100 x)).

4.3.3 Human-size dECM-Konstrukte auf Basis von *in toto* dezellularisierten ovinen Herzen

Aufgrund der Erfahrungen aus der Etablierungsphase, konnte mittels 24 h kontinuierlicher Detergenzien-Perfusion und 30 min H₂O Spülschritten in einem 2 h Intervall, eine komplett dezellularisierte kardiale EZM humaner Größe auf Basis *in toto* dezellularisierter oviner Herzen hergestellt werden. Die makro- und mikroskopischen Ergebnisse zeigen **Abb. 39** und **Abb. 40**. **Abb. 39** zeigt einen Dezellularisierungsgrad, bei der das intakte Herz bereits äußerlich keinerlei myoglobinfarbene Punkte aufzeigt. Im Schnittpräparat mit horizontaler Schnittführung auf Höhe der Klappen-, Herzbasis- und Apexebene gibt es ebenfalls keine makroskopischen Anzeichen für eine unvollständige Dezellularisierung.

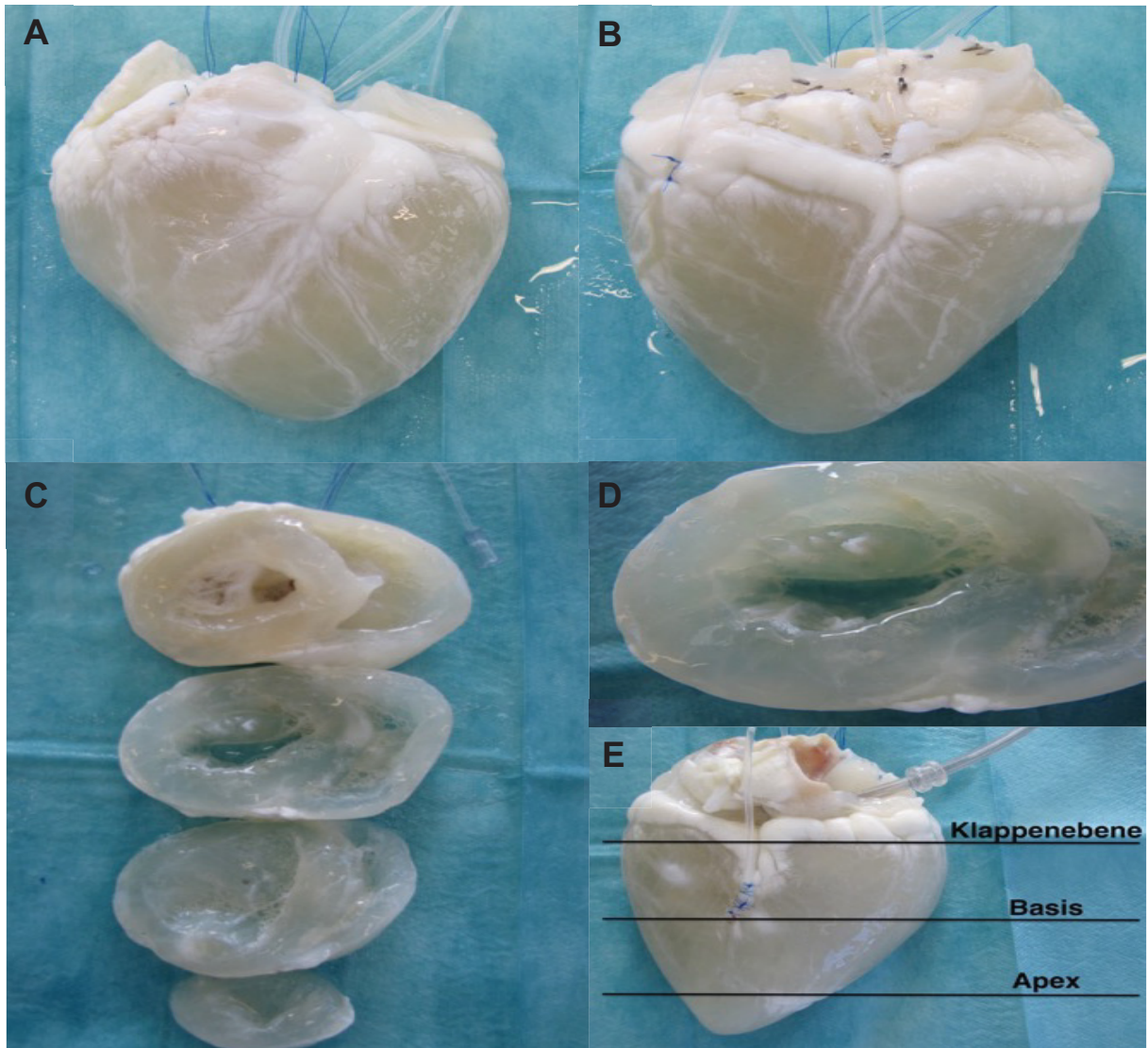


Abb. 39: Erfolgreiche vollständige *in toto* Dezellularisierung eines ovinen Herzens

(A) Vorderseite; (B) Rückseite; (C) transversale Schnittebenen; (D) Nahaufnahme LV; (E) Schema der Schnittebene.

Die Matrix stellt sich nahezu vollständig transluzent bis weißlich dar. Wie **Abb. 39c** und **d** zeigt, verbleiben sämtliche Binnenstrukturen des Herzens anatomisch vollständig intakt. Bei genauerer Betrachtung lassen sich Klappenstrukturen bis hin zu den Sehnenfäden der Mm. Papillares erkennen. Im apikalen Teil des Herzens (**Abb. 39b**) erkennt man zudem die eingebrachten Titanclips, welche zum Verschließen kleinerer Gefäßleckagen vor der Dezellularisierung verwendet wurden.

Die Bilderreihe der **Abb. 40** zeigt eine gelungene Dezellularisierung auf histologischer Ebene. Die durchgeführte Färbung mittels DAPI-Zellkernfärbung ergibt kein sichtbares DAPI-Signal in den Aufnahmen und die Durchlichtaufnahmen zeigen keinen Hinweis auf verbleibendes Zellmaterial. Vergleicht man die epikardialen, endokardialen und myokardialen Aufnahmen mit den nativen Bildern der **Abb. 35**, wird dies eindrücklich sichtbar. Die gewählten Aufnahmen stellen eine Auswahl aus den optisch am besten dezellularisierten Herzen dar. Die Unversehrtheit und vorhandene Integrität der EZM konnte bereits anhand der dargestellten H.E.- und MOVAT-Färbungen der **Abb. 37** und **38** erläutert werden. Das vorliegende Bildmaterial zeigt nun die mikroskopische Zellfreiheit der ovinen *dECM* anhand der verwendeten histologischen Immun-Fluoreszenz-Färbungen innerhalb der verwendeten repräsentativen Schnitte und konnte in repetitiven Versuchen bestätigt werden.

Damit konnte das Ziel, eine dezellularisierte kardiale EZM mit humaner Dimension herzustellen, erfolgreich erreicht werden.

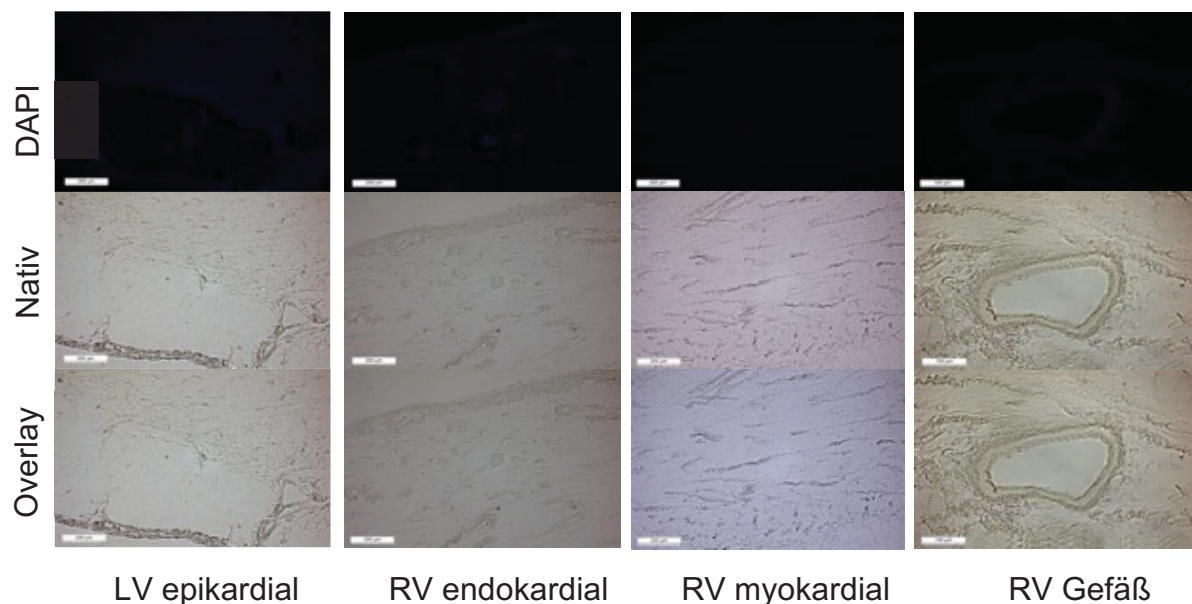


Abb. 40: Repräsentative histologische Aufnahmen einer perfusionsbasierten ovinen *in toto* Herzdezellularisierung nach DAPI-Färbung

Aufnahmen von dezellularisierten, makroskopisch zellfreien ovinen Herzen nach Probenentnahme aus epi-, myo- und endokardialen linken und rechten Ventrikel (LV u. RV) und anschließender DAPI-Färbung (6µm Paraffinschnitt), *kein DAPI-Signal und damit Hinweise auf DNA-haltige Rückstände konnten nachgewiesen werden*; linker Ventrikel epikardial (Maßstab 200 µm (100 x)); rechter Ventrikel endokardial, (Maßstab 200 µm (100 x)); rechter Ventrikel myokardial (Maßstab 200 µm (100 x)); rechter Ventrikel Gefäßanschnitt, (Maßstab 100 µm (200 x)) DAPI-Signal, Nativbild und Overlayaufnahmen.

5 Diskussion

Zahlreiche Fortschritte im Bereich des *Tissue Engineering* der letzten Jahre führten zu immer neuen, bereits klinisch anwendbaren Errungenschaften. Das Ziel, mittels *Tissue Engineering* komplexe Organsysteme zur klinischen Nutzung in der Humanmedizin zu erschaffen, ist jedoch noch immer in weiter Ferne.

5.1 Rekapitulation der Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit drei wesentlichen Kernbereichen des kardiovaskulären *Tissue Engineering* und diente dazu spezifische Lösungsansätze für derzeit bestehende Limitationen innerhalb dieser Gebiete zu untersuchen. Die gemeinsame Basis bildete dabei die dezellularisierte kardiale EZM. Hier galt es im Speziellen, weiteren *Progress* in Richtung klinischer Anwendbarkeit des kardialen *Tissue Engineering* durch die Entwicklung von Optimierungskonzepten zu ermöglichen und die Anwendungsmöglichkeiten der dezellularisierten kardialen EZM zu verbessern. Dabei wurden diese Ziele konkret umgesetzt:

- Es erfolgte die selektive Re-Endothelialisierung des vaskulären Systems *in toto* dezellularisierter Rattenherzen. Im Anschluss konnte die Möglichkeit der funktionellen Vaskularisierung von *dECM* evaluiert werden. Durch nativ und immunhistologische als auch molekularbiologische Methoden wurden dabei funktionelle *HUVEC*-Zellverbände nachgewiesen. Diese zeigten die Fähigkeit, auf äußere Stimuli adäquat zu reagieren und konnten das dezellularisierte Rattenherzgefäßsystem in großen und kleinen Gefäßkalibern auskleiden.
- Durch eigens hergestellte Peptide konnte eine selektive Biofunktionalisierung von dezellularisierten ovinen Pulmonalklappensegeln durchgeführt werden. Diese wiesen in bestimmten Versuchsgruppen eine signifikante Verbesserung der Zelladhäsion von humanen Endothelzellen auf kardialer *dECM* auf.
- Anhand eines bereits etablierten Protokolls zur Kleintierherz-Dezellularisierung wurde durch Hochskalierung und Modifikation des Protokolls die Möglichkeit zur Herstellung eines *human-size dECM*-Gerüst auf Schafsherzbasis untersucht. Nach einer umfangreichen Etablierungsphase zeigte sich letztlich ein histologisch gesichertes gutes Dezellularisierungsergebnis im Vergleich zum Kleintiermodell.

5.2 *dECM* als Basis des kardiovaskulären *Tissue Engineering*

Als zentraler Bestandteil nicht nur dieser Arbeit, sondern auch im gesamten Bereich des kardialen *Tissue Engineering* ist die dezellularisierte extrazelluläre Matrix eine Basisplattform vielfältigster Anwendungsgebiete.

„The extracellular matrix: At the center of it all“ von S. Bowers et al. aus dem Jahr 2010 beschreibt im Titel passend die zentrale Rolle der EZM nicht nur als struktur- und formgebendes Gerüst aus Kollagenen, Proteoglykanen und Glycoproteinen, sondern zeigt wie zahlreiche Arbeiten in diesem Gebiet die wichtige Rolle der EZM im komplexen Zusammenspiel der Zellproliferation, Zellkommunikation und Gewebedifferenzierung auf. Im Rahmen einer spezifischen, seitens der EZM gebildeten Mikroumgebung kommt es zum essenziellen, sich gegenseitig bedingenden Austausch von Wachstumshormonen, Adhäsionsmolekülen und Zytokinen mit den Zellen vor Ort und beeinflussen dadurch die mechanischen, chemischen und elektrischen Signalwege innerhalb des Gewebes. [32][33][104][105]

So ist es nicht verwunderlich, dass die Geschichte des kardiovaskulären *Tissue Engineering* eng mit der Entwicklung von künstlichen und biologischen Matrizen als Trägerkonstrukt für Zellen verknüpft ist. Mit der Entwicklung von *dECM*-Gerüsten konnten biologische Gewebe erschaffen werden, welche die natürliche Architektur und die Mikroumgebung des Ursprungorgans erhalten und neben den artifiziellen Pendants bereits zahlreiche prä-klinische und klinische Anwendungen ermöglichen.

5.3 Klinische Anwendung und Meilensteine der Forschung

Klinische Anwendungen des kardialen *Tissue Engineering* reichen derzeit von biologischen mit körpereigenen Zellen re-besiedelten, mitwachsenden Herzklappen [106] über myokardiale Ersatztherapien, die beispielsweise bei Myokardinfarkten als therapeutische Option die Herzfunktion verbessern können. [40][42][107] Als Meilenstein nicht nur des kardialen *Tissue Engineering* lässt sich die viel beachtete Arbeit „*Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart*“ von Harald Ott und Doris Taylor (2008) bezeichnen. Ott et al. demonstrierte hier erstmals den sogenannten *Whole-Organ-Ansatz* im kardiovaskulären *Tissue Engineering*. Anhand einer perfusionsbasierten Dezellularisierung wurden sämtliche zellulären Bestandteile eines Rattenherzens entfernt und in einem weiteren Schritt durch Re-Besiedlung des entstandenen Zellgerüsts mit neonatalen Rattenherzzellen im Bioreaktorsystem ein kontraktionsfähiges bioartifizielles Konstrukt erschaffen. [24] In weiteren Arbeitsgruppen konnten in den folgenden Jahren bereits Herzen menschlicher Größe, beispielsweise von Schweinen,

erfolgreich de-zellularisiert im Anschluss re-zellularisiert sowie erneut im Tiermodell heterotrop transplantiert werden. [65][111] Außerhalb des kardiovaskulären *Tissue Engineering* gelang es ebenso bereits, gesamte Organe erfolgreich zu dezellularisieren und diese auch zu re-zellularisieren. Hierzu zählen beispielsweise parenchymatöse Organe wie Niere, Leber, Pankreas und auch Lungen. Dabei konnten, wie z.B. im Falle der Lunge, ein zeitweiser Erhalt der Organfunktion nach Re-Implantation im Tiermodell erreicht werden. [112][113][114]

Diese bereits verzeichneten Erfolge im weiterhin „jungen“ wissenschaftlichen Feld des *Tissue Engineering* bieten das Potenzial für zukünftige revolutionäre klinische Durchbrüche innerhalb der regenerativen Medizin.

5.4 Limitationen des kardiovaskulären *Tissue Engineering*

Trotz aller Errungenschaften rückt eine routinemäßige klinische Anwendung als Organersatztherapie noch in weite Ferne. Zu komplex ist die Herstellung von funktionsfähigen artifiziellen Organsystemen mit der zugehörigen Fülle und Kombination an Zelltypen und verschiedensten Co-Faktoren. Darunter mechanische, chemische und elektrophysiologische Stimuli welche zur Ausprägung und Erhaltung von essenziellen Organfunktionen notwendig sind. So gilt es Stück für Stück kleinere und grundlegendere Limitationen zunächst besser zu verstehen und im Anschluss systematisch zu überwinden. Somit diene auch diese Arbeit dem Versuch, spezifische Verbesserungen auf dem Weg zur klinischen Anwendung von dezellularisierter kardialer Matrix zu erproben. Kardiales Gewebe ist aufgrund der anatomischen und funktionellen Aufgaben im Organismus in hohem Maße abhängig von einer kontinuierlichen Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr und reagiert *in vivo* äußerst sensibel auf Mangelzustände: Sodass ein Fortschritt zu funktionellen bioartifiziellen kardialen Ersatzorganen ganz entscheidend von einer suffizienten Vaskularisierung abhängig ist. Ohne eine Makro- und Mikrozirkulation sowie Perfusion kann das Ziel eines *Tissue-engineerten* Organs nicht erreicht werden. Limitationen ergeben sich hier durch die Gesetzmäßigkeiten der Diffusion im Gewebe und schränken dadurch die Konstruktdicke und -Größe sowie die mögliche Anzahl stoffwechselaktiver Zellprozesse unüberwindbar ein. [53] Die bisherigen Herangehensweisen innerhalb dieses Gebiets überschneiden und ergänzen sich teilweise in verschiedenen Ausführungen und befassten sich im Wesentlichen mit folgenden Strategien[115]:

- Induzierung bzw. Förderung der Neoangiogenese durch Wachstumsfaktoren und verschiedener Zytokine [116]
- Entwicklung synthetischer Konstrukte verschiedenster Art, die *in vivo* im natürlichen Kreislauf eines Organismus oder *in vitro* durch artifizielle Zellinjektion bzw. im Bio-Reaktor vaskularisiert und anschließend implantiert werden können. [117][118]
- Herstellung biomimetischer synthetischer Konstrukte, wie z.B. „Sauerstoff-Tunnel“ zur Verbesserung der Diffusion/Perfusion. [119]
- Nutzung einer bereits vorhandenen physiologischen Gefäßarchitektur als *Native Tissue Derived Scaffolds* (engl.: von nativen Geweben abgeleitete EZM-Gerüste). [24]

Jede der dargestellten Strategien unterliegt vorgegebenen natürlichen Vor- und Nachteilen. So erscheint eine vollständige Neoangiogenese bisher noch nicht ausreichend praktikabel um über die Mikrozirkulation hinaus auch gesamte Organe funktionsfähig zu vaskularisieren. Weiterhin besteht insbesondere weiterer Forschungsbedarf im Hinblick auf maligne Entartungstendenzen. Die Entwicklung synthetischer Zell-Gerüste und biomimetischer Konstrukte bleibt bisher auf einfachere tubuläre und wenig verzweigte lineare Geometrien limitiert. Der Komplexität in Aufbau und Anforderungen natürlicher Gewebe und Organe konnte man bisher noch nicht gerecht werden. Gegebenenfalls ist hier mit der Entwicklung neuerer Verfahren, wie z.B. biologischen 3D-Druckverfahren neuer Fortschritt realisierbar. Die Herstellung und Verwendung von *Native Tissue Derived Scaffolds* wie innerhalb dieser Arbeit anhand des *Tissue Flap*-Modells [38] geschehen, bietet den Vorteil einer bereits natürlich angelegten Geometrie und eines perfusionsfähigen Gefäßsystems sowie der Bereitstellung der erforderlichen Mikroumgebung – ein Vorteil beispielsweise gegenüber synthetisch hergestellten Konstrukten. Das vorhandene organspezifische dezellularisierte Gefäßsystem innerhalb eines *dECM*-Konstruktes allein reicht jedoch nicht aus. Ohne kontinuierliche und funktionelle Endothelauskleidung kann eine suffiziente Vaskularisierung zum Sauerstoff und Nährstoffaustausch, sowie zur Regulation von Gerinnungs- und Immunprozessen nicht gelingen. Nachteilig wirkt sich die geringe Reproduzierbarkeit und Standardisierung von natürlichem Gewebe auf potenzielle wissenschaftliche und klinische Anwendungen aus.

5.5 Funktionelle Vaskularisierung dezellularisierter kardialer EZM

Innerhalb dieser Arbeit konnte unter Verwendung einer dezellularisierten kardialen Matrix eine selektive Vaskularisierung des Gefäßsystems mittels *HUVECs* erreicht werden. Durch nativ- und immunhistologische Färbungen konnte eine nahezu kontinuierliche Auskleidung größerer Abschnitte des koronaren Gefäßsystems mit vitalen Zellen in kleinen und großen Gefäßdurchmessern nachgewiesen werden. 3D-Aufnahmen mit dem Konfokal-Lasermikroskop zeigten zudem die Ausbildung natürlich verzweigter Gefäßbäume innerhalb des Konstrukts, welche in einem vergleichbaren Maße innerhalb eines synthetischen Ansatzes, wie z.B. aus Kollagen oder Alginate nicht zu finden sind. Zudem gelang durch Immunhistologie und auf molekularbiologischer Ebene der Nachweis einer gewissen Funktionalität durch endothelspezifische Marker. Da die vorliegenden Ergebnisse auf kleinen Versuchsgruppen und Evaluation rudimentärer intrazellulärer Zellfunktionen basieren, sind die Ergebnisse lediglich als weiteren Schritt in Richtung suffizienter Vaskularisierung zu sehen. In weiterführenden Studien gilt es nun die Vaskularisierung beispielsweise innerhalb geschlossener Bioreaktorsysteme [24] [49][121] weiter zu verbessern um eine lückenlose Endothelschicht zu gewährleisten sowie die Funktionalität mittels weiterer spezifischer Marker, z.B. zur Kreislaufregulation oder beispielsweise in Perfusionsversuchen in punkto Thrombogenität zu evaluieren. Arbeiten mit teilweise vergleichbaren Versuchsaufbauten konnten hier bereits eine verringerte Thromboseneigung in Perfusionsversuchen zwischen re-endothelialisierten und nativen *dECM*-Konstrukten demonstrieren. [54]

5.6 Biofunktionalisierung dezellularisierter kardialer EZM

Ein weiterer Ansatzpunkt in der Optimierung von *dECM*-Konstrukten ergibt sich durch eine gezielte Beeinflussung der *dECM*-Oberflächenbeschaffenheit. Innerhalb dieser Arbeit wurde hierzu mittels bioaktiver Peptide eine Biofunktionalisierung dezellularisierter oviner Pulmonalklappensegel vorgenommen. Das Ziel eine verbesserte Zell-Matrix-Interaktion zu erreichen, konnte durch Kombination der bioaktiven Sequenzen RGD/REDV und RGD/YIGSR erreicht werden. Diese aus zelladhäsionsvermittelnden Proteinen wie Integrin, Fibronectin und Laminin abgeleiteten biomimetischen Peptide konnten eine messbare und teilweise signifikante Steigerung der Zelladhäsion von *HUVECs* auf dezellularisierter kardialer EZM erreichen. Eine prinzipielle Einflussnahme zur gezielten Modulation von Eigenschaften der *dECM*-Oberfläche scheint somit eine weitere plausible Möglichkeit um verschiedenste Zell-Matrix-Interaktionen zum Vorteil zu steuern. Eine direkte Translation hin zur klinischen Anwendung ist hier z.B. im chirurgischen Herzklappenersatz denkbar, da bisherige Limitationen der Verfahren durch oberflächenvermittelte adverse Reaktionen immunologischer oder thrombogener Natur in frühzei-

tigem Implantatversagen z.B. durch mangelnde frühzeitige Endothelialisierung oder durch vermehrter Kalzifikation, münden. [122][59]

Bisherige Studien im Bereich der proteinbasierten Oberflächenfunktionalisierung verschiedenster biologisch eingesetzter Oberflächen, darunter auch von orthopädischen oder ophthalmologischen Implantaten [123] und insbesondere vaskulärer Konstrukte, konnten bereits wegweisende Ergebnisse liefern. So konnten mittels Fibronectin beschichteter in den Körperkreislauf einer Ratte eingebundener *dECM*-Konstrukte eine schnellere Endothelialisierung und verbesserte Biointegration der tubulären Konstrukte erzielt werden. [124] Weitere proteinbasierte Ansätze zielen darauf ab z.B. Wachstumsfaktoren wie VEGF oder spezielle Antikörper in synthetischen oder natürlichen Geweben vermehrt zu binden und dadurch eine schnellere oder vermehrte Endothelialisierung bzw. Biointegration zu erreichen. [125] Als nachteilig erweist sich hierbei der Einsatz natürlich vorkommender oftmals unspezifischer Proteine, wie z.B. Fibronectin und Laminin, da es durch eine entsprechende Funktionalisierung zwar zur schnelleren und vermehrten Anreicherung von endothelspezifischen Zellen kommt, diese aber ebenfalls eine nicht erwünschte Hyperplasie der Gefäßintima zur Folge hatte. [124]

Innerhalb dieser Arbeit wurden eigens durch eine Kooperation mit dem *Department of Material Science and Metallurgical Engineering* der *Technical University of Catalonia* in Barcelona entwickelte Peptide verwendet, welche ausschließlich die Hauptsequenzen passend zu den entsprechend ausgewählten Zelladhäsionsrezeptoren beinhalten. Durch Beschichtung von ovinen Pulmonalklappensegeln mittels dieser spezifischen bioaktiven Gruppen, konnte innerhalb einer *in vitro* Studie eine gesteigerte Zelladhärenz nach 1 und 4 Stunden Inkubation mit humanen Nabelschnurvenenzellen demonstriert werden. Die besten Ergebnisse lieferten hier die Kombinationen der Aminosäuresequenzen RGD/YIGSR und RGD/REDV. Und deutet auf eine wichtige Rolle der durch RGD vermittelte Zelladhäsion durch Bindung an Integrin $\alpha_4\beta_1$ hin. Die beobachteten besseren Ergebnisse durch die Kombination mit dem YIGSR- und REDV-Motiv erlauben die Postulierung von synergistischen Effekten.

In weiteren Versuchen ist es hier sicherlich notwendig, über diese *Proof of Concept*-Studie hinaus weitere Variablen zu untersuchen. Aufgrund der Komplexität der organspezifischen EZM liegt es nahe, entsprechende maßgeschneiderte biofunktionelle Peptide für die jeweilig gewünschte Reaktion, Anwendung und Oberfläche zu entwickeln, um den bestmöglichen Effekt im Zielgewebe zu erreichen. Die Erforschung von synergistischen oder nachteiligen Effekten von Veränderungen in Konzentration, Kombination und Auswahl des Zielligands bis zum gewünschten Effekt *in vivo* trägt das Potenzial für weitere mehrjährige Forschungsvorhaben.

Anhand der in *in vivo* Versuchen gewonnen Daten gilt es nun, die Translation zur klinischen Anwendung zu meistern. In weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe wurde die Biofunktionalisierung durch die synthetischen Peptide innerhalb eines Aorteninterponat-Transplantationsmodell *in vivo* untersucht. Trotz erfolgreicher Beschichtung und erkennbarem biologischem Effekt konnte hier im Vergleich zur Kontrollgruppe ein nicht signifikanter Anstiegstrend zur gesteigerten luminalen Re-Endothelialisierung nach Explantation des 14 Tagen *in situ* befindlichen Interponats festgestellt werden. [126]

Die Oberflächenfunktionalisierung in der kardiovaskulären Medizin und insbesondere im Bereich des *Tissue Engineering* bietet insgesamt großes Potenzial zur Verbesserung bereits etablierter Methoden. Darüber hinaus ist es durchaus wahrscheinlich, dass durch Veränderung/Optimierung biologischer Oberflächen durch spezielle Beschichtungen neue Verfahren und Therapien z.B. durch Optimierung der Re-Endothelialisierung erst ermöglicht werden.

5.7 Herstellung von *human-size dECM*-Gerüsten

Parallel zu den unternommenen Anstrengungen zur Optimierung der Oberflächenbeschaffenheit der EZM und der Durchführung einer funktionellen und selektiven Re-Besiedlung des Gefäßsystems im Rattenherzmodell wurde im dritten Abschnitt dieser Arbeit ein weiterer notwendiger Schritt auf dem Weg zur klinischen Anwendung in Angriff genommen. Konkret wurde anhand der Erfahrungen mit dem bereits etablierten Kleinherzdezellularisierungsverfahren unter Verwendung eines gleichenden Protokolls eine *human-size dECM* auf oviner Basis hergestellt. Durch die Benutzung von Schafsherzen ist es hierbei gelungen durch wenige Änderungen an einem bereits etablierten und simplen auf Detergenzien basierenden Protokoll eine EZM Plattform in menschenähnlicher Größe herzustellen. Die wesentlichen Unterschiede zum bereits an Rattenherzen etablierten Verfahren innerhalb der Arbeitsgruppe bestanden in der größeren Biomasse, die es aus der EZM auszuwaschen galt. Hier war es notwendig, die Reaktionsgefäße und Kannülierungstechniken entsprechend anzupassen. Zusätzlich musste, um einer Sättigung des Perfusats zu entgehen, eine ausreichend hohe Menge an Detergenzien eingesetzt werden, um eine suffiziente Dezellularisierung zu gewährleisten. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch das durch kleinere Änderungen des Protokolls die Erschaffung eines reproduzierbaren *human-size dECM*-Herzens anhand eines bereits etablierten Kleinherzdezellularisierungsprotokolls möglich ist. Wenn auch gleich hierfür eine beachtlich größere Menge an Materialeinsatz notwendig ist. Die Ergebnisse der makroskopischen und histologischen Auswertung lassen auf einen hohen Grad der Zellfreiheit schließen, wenn auch auf mikroskopischer und immunologi-

scher Ebene DNA-Reste in Teilabschnitten nicht vollständig entfernt werden konnten. Die Qualität und Integrität der EZM stellt sich ebenfalls anhand der vorliegenden histologischen Färbungen mit den Ergebnissen des Kleintiermodells vergleichbar gut dar. Das Vorhaben, Herzen in menschenähnlicher Größe zu dezellularisieren, konnte bereits von mehreren Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Ansätzen realisiert werden. So wurden erstmals porcine Herzen als Basis der *human-size Whole-Heart*-Dezellularisierung genutzt. Als erfolgreichstes Modell hat sich dabei die perfusionsbasierte Methode der Dezellularisierung gezeigt. Diese kann anhand verschiedener modifizierter Protokolle mit additiven enzymatischen oder anderen zelldisruptiven Methoden kombiniert werden und wurde von den meisten Arbeitsgruppen benutzt. [127][128] Der Vorteil des *Whole-Organ*- und perfusionsbasierten Ansatzes besteht dabei in der Erhaltung der biologisch-physiologischen Infrastruktur. Auf makroskopischer Ebene bedeutet dies die Präservierung der Gefäßarchitektur und reicht bis auf molekulare Ebene. Da die innerhalb der EZM enthaltenden Wachstumsfaktoren und weiteren zahlreichen Bestandteilen der vorherrschenden Mikroumgebung durch vorgenannte Ansätze weiterhin ihren imminanten Einfluss ausüben können. Hier stellt sich zwangsläufig die Frage inwieweit diese Faktoren die innerhalb einer ständig sich verändernden und auf die Umwelteinflüsse reagierenden EZM (*Dynamic-Reciprocity*-Modell) [31] durch einen vollständig artifiziellen Ansatz ausgeglichen werden könnten. Weiterhin kommt die Frage auf, inwiefern sich die xenogenen *dECM*-Konstrukte nachteilig in der klinischen Anwendung im menschlichen Organismus verhalten. Gerade aufgrund ihrer geschätzten dynamischen und hochspezifischen Eigenschaften gilt es hier die adversen Effekte, wie sie z.B. bei künstlichen Herzklappen im Rahmen von Kalzifizierungen beobachtet werden, weitergehend zu untersuchen. [129] Indessen wurden die Erkenntnisse der bisherigen Tierversuche angewendet, um erste humane Spenderherzen aus nicht transplantierbaren Herzen erfolgreich zu dezellularisieren und die Möglichkeiten, die sich daraus ergeben, weiter zu erforschen. [52]

5.8 Mögliche Zukunft des kardiovaskulären *Tissue Engineering*

Zukünftig gilt es analog des Ingenieurbegriffs die Teilgebiete und diversen Disziplinen des *Tissue Engineering* wie einen Baukasten zu nutzen, um aus Einzelteilen komplexe biologische Konstrukte menschlicher Größe zu erschaffen. Anhand der innerhalb dieser Arbeit evaluierten Teilgebiete sind nach entsprechendem weiterführendem Forschungsprogress folgende Möglichkeit zur Kombination dieser denkbar. Durch geeignete Dezellularisierungsverfahren auf kardiovaskulärem Gebiet werden je nach Anwendung humane oder xenogene *dECM*-Plattformen geschaffen. Im Rahmen einer funktionellen Vaskularisierung werden eine Infrastruktur

erzeugt und die Nährstoffversorgung für Stoffwechselprozesse ermöglicht. Durch Biofunktionalisierung der *dECM* können die Vaskularisierung selbst oder weiterführende Zell-Matrix-Interaktionen gezielt hinsichtlich der gewünschten Zell-Zusammensetzung und resultierend auch Gewebefunktion beeinflusst werden. Hierdurch lässt sich eine Basisplattform generieren, welche anhand der bereits herausgearbeiteten Vorteile in besonderer Weise geeignet ist, bioartifizielle Gewebe herzustellen. Dabei folgt dieser Ansatz dem von Langer und Vacanti bereits 1993 aufgestellten allgemeinen Paradigma des *Tissue Engineering*, welches die Erzeugung eines funktionellen bioartifiziellen Ersatzorgans durch Kombination von geeigneten (pluri-)potenten Zellverbänden, künstlichen oder von nativen Geweben stammenden Trägermatrizen und adäquater physiologischer Stimuli postuliert. [130]

Die Bestrebung Teilbereiche des *Tissue Engineering* aus der notwendigen und zunächst sinnvollen Diversifikation erneut zusammenzuführen, mit dem Ziel, funktionelle Ersatzorgane innerhalb eines *Whole-Organ-Engineering*-Ansatzes zu generieren, führte zu bereits beachtlichen Erfolgen. So zeigte Taylor und Ott et al. (2008) innerhalb der bereits mehrfach zitierten Arbeit „*Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*“ [24] nicht nur die Möglichkeit der *in toto* Dezellularisierung von Rattenherzen, sondern zusätzlich die Anwendung eines Bioreaktorsystems zur myokardialen Wiederbesiedlung der *dECM* durch neonatale Rattenkardiomyozyten. Unter physiologischen Bedingungen unter anderem durch elektrophysiologische sowie mechanische Stimulation konnte nach 8 Tagen eine eigenständige Pumpfunktion beobachtet werden. Diese entsprach ca. 2 % eines vergleichbaren adulten Rattenherzens. Neben der Weiterentwicklung von *human-size dECM*-Konstrukten anhand oviner oder porciner Herzen wurden indes bereits humane Transplantate dezellularisiert und als Plattform des bioartifiziellen Herzersatzes evaluiert. [52] Einen weiteren Schritt konnte Kitahara et al. (2016) gehen und erfolgreich heterotrope Transplantationen de- und anschließend re-zellularisierter porciner Herzen vornehmen. Diese Arbeit zeigt eindrücklich die technische Machbarkeit von heterotropen Transplantationen mit zunächst suffizienter Gefäßperfusion ohne Anhalt auf Leckagen im *dECM*-Konstrukt. Sowohl im *dECM*-Konstrukt als auch im mittels mesenchymaler Stammzellen re-zellularisierten Herzen, bildeten sich erhebliche Thromben aus, die letztendlich zum Verschluss und Versagen großer Blutgefäße führte. [111] An dieser Stelle schließt sich der Kreis. Die suffiziente Dezellularisierung und Herstellung des *dECM*-Gerüsts als auch die chirurgisch technische Durchführung sind bereits etablierte Methoden. Nun gilt es, durch funktionelle Vaskularisierung gegebenenfalls in Verbindung mit Biofunktionalisierung der *dECM*-Oberflächen, eine suffiziente Re-Endothelialisierung zu erreichen. Nur durch eine funktionelle Endothelauskleidung, welche es ermöglicht, die Thrombogenizität auf ein durch

medikamentös beherrschbares Niveau zu senken, wird es zudem möglich sein, ein multifaktorielles (immunologisch, inflammatorisch, thrombogenes) Implantatversagen zu verhindern und durch eine ausreichende Nährstoffversorgung Stoffwechselprozesse zu ermöglichen.

5.9 Eignung und Limitationen der angewandten Methoden

Der Versuch dieser Arbeit, Lösungsansätze von drei unterschiedlichen Kernlimitationen des kardialen *Tissue Engineering* zu finden, erforderte den Einsatz unterschiedlichster Methoden, welche lediglich einen Teilaspekt abdecken konnte. Jede verwendete Methode und Analyse unterliegt naturgemäß eigenen methodisch bedingten, technischen und biologischen Limitationen und ist insbesondere im Hinblick auf eine Vergleichbarkeit der verwendeten Spezies kritisch zu werten. Obgleich die adressierten Hindernisse im kardiovaskulären *Tissue Engineering* als allgemein gültig angesehen werden können, war es lediglich möglich wichtige Teilbereiche zu beleuchten. Hier ist es allgemein notwendig durch weitere Studien die gewonnen ersten Ergebnisse weiter zu validieren und im Hinblick der klinischen Übertragbarkeit zu überprüfen.

5.9.1 Auswahl der Spendertiere und Übertragbarkeit der Ergebnisse

Die Auswahl der Wistar-Ratte als Spendertier zur Kleinherzdezellularisierung erfolgte aufgrund der guten Verfügbarkeit der Spezies, sowie der langjährigen Erfahrung der Arbeitsgruppe mit der Dezellularisierung von Rattenherzen. Als auch der damit einhergehenden nachgewiesenen Reproduzierbarkeit der Dezellularisierungsqualität, insbesondere auch im Hinblick auf die erwarteten hohen Versuchszahlen. Die verwendeten Wistar Ratten hatten ein Gewicht von 300-350 g, damit konnte eine gute Persistenz in Organgröße und anschließender Qualität der Dezellularisierung mit sehr guter Vergleichbarkeit der Proben erreicht werden. Die Gewinnung der Spenderorgane erfolgte äußerst standardisiert nach einem bereits mehrjährigen etablierten Verfahren und bietet demnach ein gutes Maß an Validität. Für die Etablierung der Großherzdezellularisierung, sowie für die Gewinnung der ovinen Pulmonalklappensegel zur Biofunktionalisierung wurden Herzen von 20-25 kg schweren Lämmern zur kommerziellen Schlachtung und Fleischverarbeitung von einem nahe gelegenen Schlachthof bezogen. In einer Vorauswahl wurden dabei, nach Schlachtung durch den Betrieb, die noch körperwarmen Schlachtherzen im Perikardbeutel auf Unversehrtheit geprüft und im Anschluss mittels Heparin und Streptokinase gespült und anschließend auf Eis gelagert. Hierdurch konnte bereits ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit erreicht werden. Jedoch musste hier im Stadium der Etablierung des Verfahrens ein Kompromiss hinsichtlich Verfügbarkeit der Herzen und der eingesetzten Ressourcen gemacht werden. Für die Zukunft wünschenswert ist hier sicherlich die Möglichkeit der Aufzucht

und Kontrolle der Tiere in einer Tierversuchsanlage. Hierdurch ermöglicht wäre dadurch beispielsweise eine *in vivo* Antikoagulationstherapie zur Vermeidung von *post mortalen* Blutkoageln im Gefäßsystem des Herzens, sowie die Möglichkeit der chirurgischen Explantation des Organs, um die bestmögliche Qualität der Spenderherzen und der anschließenden Dezellularisierung sicherzustellen.

Bei der Auswahl der Spenderspezies kommt es unvermeidbar zur Frage nach der klinischen Anwendbarkeit im Bezug zur menschlichen Physiologie und Anatomie. Hier zeigt sich das kardiovaskuläre System der Säugetiere als in Physiologie, Anatomie und Zusammensetzung der EZM als artenübergreifend überaus konsistent. Sodass eine Übertragung der klinischen Anwendbarkeit bei Berücksichtigung der Größenverhältnisse als durchaus möglich erscheint.

Unbestreitbar ist die Aussagekraft der im Tiermodell und vor allem im Rattenmodell gewonnen Erkenntnisse limitiert und ermöglicht lediglich Anhaltspunkte in punkto klinischer Anwendbarkeit, welche in zusätzlichen prä-klinischen Studien zunächst weiter evaluiert werden müssen. Weitere Limitationen ergeben sich durch die angewandten speziellen Methoden der Teilgebiete dieser Arbeit und werden im Folgenden an entsprechender Stelle behandelt.

5.9.2 Methodik der Dezellularisierung

In der experimentellen Phase dieser Arbeit wurden insgesamt zwei Arten der Gewebsdezellularisierung angewandt. Einerseits wurde eine perfusionsbasierte *in toto* Organdezellularisierung der Klein- und Großtierherzen und andererseits eine diffusionsbasierte Gewebsdezellularisierung der verwendeten Schafsherzpulmonalklappen verwendet.

Durch Standardisierung und computergestützte Steuerung der verwendeten Protokolle konnte über einen kontinuierlichen Fluss des Perfusats, hauptsächlich über das arterielle System der Koronargefäße der Spenderherzen, eine hohe reproduzierbare Qualität der Dezellularisierung erreicht werden. Das höchste Maß der reproduzierbaren Qualität erreichte dabei, aufgrund der längeren Erfahrung und besseren Kontrollierbarkeit der äußeren Einflussfaktoren, die Kleinherzdezellularisierung. Hier gilt es das hohe Maß an Standardisierung und Kontrolle auch auf das Großherzmodell anzuwenden. Hierzu zählt wie bereits erwähnt, die Anwendung einer *in vivo* Antikoagulation unter Tierversuchsbedingungen, um thrombotisch bedingte unzureichende Dezellularisierungsergebnisse weiter reduzieren zu können. Ebenfalls werden eigens angepasste Reaktionsgefäße der Dezellularisierungsanlage zur Gewährleistung von Sterilität und besserer Abschirmung vor äußeren Einflüssen, wie sie bereits von anderen Arbeitsgruppen wie z.B. Weymann et al. [65] eingesetzt werden und innerhalb der eigenen AG im Rahmen der Kleinherzde-

zellularisierung bereits etabliert sind, für eventuelle Re-Besiedlungsvorhaben von Großtierherzen unabdingbar sein. Im Falle der Gewebsdezellularisierung mittels Detergenziendiffusion wurden ebenfalls langjährig etablierte Verfahren eingesetzt, die ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit gewährleisten. Das Verfahren der Dezellularisierung ist bereits Thema zahlreicher Veröffentlichungen gewesen und deshalb im Bereich des *Tissue Engineering* in an das Organ oder Material angepassten Variationen als Standardverfahren anzusehen. [30][35][36] Wichtig als Voraussetzung der weiteren Verwendung des dezellularisierten Materials ist die weitestgehende Integrität und Unversehrtheit der EZM. Deshalb ist es unabdingbar, Protokolle zu verwenden, die das höchstmögliche Maß an Zellfreiheit mit gleichzeitiger Schonung der EZM gewährleisten.

5.9.3 Funktionelle Vaskularisierung dezellularisierter kardialer EZM

Die Probenanzahl war aufgrund der langwierigen und ressourcenaufwendigen Versuchsaufbauten dieser Arbeit als Kompromiss zwischen Praktikabilität und statistischer Aussagekraft gewählt worden. Insgesamt wurden 28 Rattenherzen speziell für diese Arbeit dezellularisiert. Es wurden $n = 8$ Herzen zur histologischen Aufarbeitung mit *HUVECs* re-endothelialisiert und histologische Schnitte aus mehreren Regionen der Herzen ausgewertet. 20 Herzen wurden für die molekulargenetischen Untersuchungen der Studie verwendet. Insgesamt konnten 15 re-endothelialisierte Herzen den geforderten Standard erfüllen und der PCR-Analyse zugeführt werden. Unbestreitbar stellen sich die ermittelten Ergebnisse mit statistisch signifikanter Testung als limitiert aussagekräftig da. Dies gilt insbesondere für die molekularbiologische Auswertung mittels PCR, die eine große Varianz zwischen den einzelnen Proben zeigte. In Zusammenschau aller verwendeten Methoden erreichen die beobachteten Trends jedoch einen validen Erkenntnisgewinn. Im Bereich der histologischen Auswertungen erfolgte keine im engeren Sinn objektivierbare Auszählung oder statistische Einordnung z.B. des Re-Endothelialisierungserfolgs. Vielmehr wurde anhand des „Alles oder Nichts“-Charakters der gelungenen Besiedlung aller histologischen und immunhistologischen Schnitte verfahren und repräsentative Schnitte anhand definierter Kriterien interpretiert. Als kritisch muss auch die Aussagekraft und Übertragbarkeit der verwendeten humanen Zellverbände im Rattenmodell gewertet werden. Trotz vergleichbarer EZM-Zusammensetzung der Spezies bleiben hier begründete Zweifel hinsichtlich der dadurch bedingten Interaktionen auf zellulärer Ebene.

Die zur molekularbiologischen Evaluation der Funktionalität ausgewählten Zielgene bieten nur ein Schlaglicht auf komplexe biomolekulare Vorgänge und Regelkreisläufe und dienen lediglich als *Proof of Concept*-Ansatz. Im Rahmen weiterer Genexpressionsversuche ist es sicher notwendig, zusätzliche Zielgene zu evaluieren, um ein umfassenderes Bild der Funktionalität zu

erlangen. Weiterhin ist die Aussagekraft von *in vitro* erlangten Erkenntnissen zur Genexpression und eine entsprechende Übertragbarkeit in den lebenden Organismus naturgemäß limitiert.

Als problematisch zeigte sich auch die zur molekulargenetischen Aufarbeitung notwendige Extraktion von DNA/RNA aus den gewonnenen Proben. Sodass aufgrund eines Mangels an verwertbarer RNA in den entsprechenden Proben einzelne Zielgene nicht ausgewertet werden konnten. Als Ursache zu diskutieren ist an dieser Stelle das aufgetretene Missverhältnis zwischen re-besiedelter Zellzahl und entsprechendem DNA/RNA-Gehalt sowie deren Qualität nach Extraktion. Wie den erhobenen RIN-Werten als Qualitätsmerkmal für die Integrität der extrahierten RNA entnommen werden kann, zeigten sich hier enorme Unterschiede der Zellkulturkontrolle (2D-Modell) gegenüber denen des untersuchten *Tissue-Flap*-Modells (3D-Modell). Dies betraf sowohl qualitative als auch quantitative Messungen. Mögliche Erklärungen könnten die zur Extraktion genutzten Methoden liefern. Vermutlich war es durch die genutzten Methoden nicht sicher und zuverlässig genug möglich, eine in Relation geringe Menge an DNA/RNA aus einer großen Menge an extrazellulären Bestandteilen zu filtern, ohne einen signifikanten Substanzverlust und eine zusätzliche Degradation der extrahierten Substanz zu bewirken. Die entsprechenden RIN-Werte und der absolute Gehalt an RNA im Vergleich lassen diese Vermutung zu (vgl. **Abb. 23** und **24**).

5.9.4 Oberflächenbiofunktionalisierung von dezellularisierter kardialer EZM

Zur Auswertung der angefertigten Bilder wurde ein standardisiertes durch Bildverarbeitungsprogramme gestütztes Verfahren eingesetzt. Dies diente einerseits dem Ausgleich der Untersucherreliabilität, andererseits war es dadurch auch möglich, eine bessere Vergleichbarkeit hinsichtlich der biologisch auftretenden Varianzen zu gewährleisten. Beispielsweise konnte die wellenartige Struktur des re-besiedelten Klappensegels mit einer Art Berg und Tal-Morphologie und damit einhergehenden Bildung von Zellnestern besser ausgeglichen werden (vgl. **Abb. 14** und **30**). Eine bessere Beurteilung von Varianzen wie sie durch unterschiedliche Belichtungsstärken und einem von zentral nach peripher abnehmender Belichtungsstärke der verwendeten Fluoreszenzlampe auftrat, konnte ebenfalls kompensiert werden. Die Einteilung des Gesamtbildes in Viertel sowie wiederum in 36 einzeln bewertete Abschnitte mit anschließend gemittelten Werten der sogenannten *Area of Interest* diente ebenfalls der Verbesserung und Steigerung der Objektivierbarkeit. Für die Oberflächenfunktionalisierung oviner kardialer *dECM* wurden insgesamt 12 Versuchsgruppen zu je $n = 3$ verwendeten Segeln pro Gruppe verwendet. Durch die Verwendung einer softwaregestützten semiquantitativen Auswertungsmethode sowie durch Mittelung der Ergebnisse war es möglich, bei einer Probengröße von $n = 3$

pro Versuchsgruppe mit deutlichen Varianzen innerhalb der Gruppen durchaus valide Aussagen treffen zu können. Insgesamt war es trotz der auf statistischem Niveau relativ geringen Probenanzahl der gesamten Arbeit möglich, durchaus wertvolle Informationen und Rückschlüsse anhand der verwendeten Methoden zu gewinnen.

Weitere Limitationen der angewandten Methoden ergeben sich zusätzlich durch die Auswahl der Spendertiere und den Tierversuch an sich. Die Übertragbarkeit der *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse in den lebendigen Organismus bleibt limitiert, ebenso sind mögliche speziesabhängige Interaktionen zu bedenken. Dies gilt insbesondere für die Interaktion der verwendeten Peptidkombinationen. Inwieweit sich hier Unterschiede der spezifischen EZM Oberfläche in Verbindung mit eingesetzter Peptidsequenz und imitiertem Bindungsmotiv in Bezug zur Zielspezies ergeben, muss ebenfalls weiterführend evaluiert werden. So lassen sich die innerhalb dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse zur Biofunktionalisierung von *dECM*-Konstrukten derzeit lediglich als *Proof of Concept*-Studie sicher verwerten.

Auch die Auswahl der individuellen Peptidsequenz für das erwünschte Resultat benötigt intensive weiterführende Forschung. Denkbar sind Studien zur genauen Funktion und synergistischen Wirkung der entsprechenden Kombinationen. Zur weiteren Ausschöpfung des Potenzials sind z.B. Versuche mit erhöhter Peptidkonzentration und ggf. einer Dreierkombination zu erwägen. Entsprechende Versuche, eine Art Doppelpeptid mit zweifacher funktioneller Gruppe herzustellen, konnten bereits durch die AG um Mas Moruno et al. etabliert werden. [90]

5.9.5 Generierung von kardialen human-size *dECM*-Gerüsten

Für die Generierung der *human-size dECM*-Gerüste kam es während der umfassenden Etablierungsphase zu 12 Dezellularisierungsvorhaben. Histologische Auswertungen wurden nur von den am besten dezellularisierten Exemplaren angefertigt. Hier erfolgte die Auswertung anhand mehrerer Lokalisationen und mehreren Ebenen des gewonnenen Gewebes. Aufgrund des *Proof of Concept*-Charakter erfolgte keine statistische Auswertung der Ergebnisse. Die Auswahl der Proben sowie die Auswertung mehrerer Regionen einer Probe mit der Aufarbeitung zahlreicher Schnittebenen konnten einen detaillierten Überblick über den Erfolg bzw. die Schwachstellen des Vorhabens darstellen.

Die vorliegenden histologischen Ergebnisse lassen lediglich eine orientierende Evaluation der Zellfreiheit und Integrität der *dECM* zu. Hier gilt es in weiterführenden Arbeiten mittels immunhistologischer und molekularbiologischer Methoden die Eigenschaften der *dECM* genauer zu betrachten.

5.10 Zusammenfassung

Zahlreiche Forschungsvorhaben im Bereich des *Tissue Engineering* beschäftigten sich in der Vergangenheit mit beachtlichen Erfolgen hinsichtlich des Ziels, eine alternative Organ- und Gewebeersatztherapie für den klinischen Einsatz zu entwickeln. Mit der *in toto* Dezellularisierung von Organen und Organanteilen sowie rudimentären zellulären Re-Besiedlungstechniken konnten erste konkrete Anwendungsmöglichkeiten bereits erfolgreich im klinischen Einsatz etabliert werden. Bis zum suffizienten bioartifiziellen Ersatz komplexer Organe gilt es jedoch noch erhebliche Limitationen zu überwinden. Innerhalb dieser Arbeit konnten nun mit Fokus auf die Extrazelluläre Matrix drei Optimierungskonzepte zur Überwindung dieser aktuellen Hindernisse vorgestellt und untersucht werden. Zusammengefasst galt es mithilfe einer funktionellen Vaskularisierung der dezellularisierten Matrix, Lösungsansätze zur derzeit ungelösten Frage der Nährstoff und Sauerstoffversorgung sowie Thrombogenizität größerer bioartifizieller Konstrukte zu liefern. Mithilfe einer selektiven Biofunktionalisierung der kardialen EZM wurden Einflussmöglichkeiten auf die Verbesserung von Zell-Matrix-Interaktionen evaluiert. In einem weiteren Abschnitt wurden das Dezellularisierungsprotokoll eines Kleintiermodells zur Herstellung eines *human-size dECM*-Gerüsts nach entsprechender Anpassung angewendet und anschließend evaluiert. Innerhalb der beschriebenen Limitationen konnte auf immunhistologischer und molekularbiologischer Ebene eine selektive und funktionelle Re-Besiedlung von menschlichen Nabelschnurvenenzellen (*HUVEC*) in einem dezellularisierten Rattenherzgefäßsystem erfolgreich durchgeführt werden. Durch die angewandte Biofunktionalisierung mittels adhäsionsvermittelnder Peptide konnte eine Verbesserung der Zelladhäsion auf *dECM* beobachtet werden. Diese konnte durch eine Peptidkombination und der Besiedlung mit *HUVECs* auf ovinen Pulmonalklappensegeln erreicht werden. Durch die erfolgreiche Etablierung und Skalierung eines modifizierten Kleintier-Dezellularisierungsprotokolls konnte anhand der histologischen Auswertung die Zellfreiheit der verwendeten ovinen *dECM* im Rahmen eines „*Proof of Concept*“ Großherzdezellularisierungsansatzes erzielt werden.

Zukünftig wird es notwendig sein die Erkenntnisse der einzelnen Forschungsbereiche des *Tissue Engineering* weiter auszubauen und zu bündeln, um die weiterhin vorhandenen Limitationen auf dem Weg zum maßgeschneiderten Organersatz zu durchbrechen.

Hierzu gilt es insbesondere:

- die Herstellung von menschengroßen *dECM*-Organgerüsten mit zugehöriger regulatorischer Mikroumgebung,
- die zelluläre Re-Besiedlung in seiner Gänze und Komplexität z.B. durch funktionelle Biofunktionalisierung,
- als auch die suffiziente Vaskularisierung und Versorgung der Zellen mit essenziellen Faktoren und Sauerstoff

durch weitere Forschung konsequent zu verbessern und durch geeignete Methoden, wie z.B. Bioreaktorsysteme in ein großes Ganzes zusammenzuführen.

Literaturverzeichnis

- [1] C. Protzel, A. Führer, and O. W. Hakenberg, "Terminales Nierenversagen und Indikation zur Nierentransplantation," *Urologe*, vol. 54, no. 10, pp. 1356–1361, 2015.
- [2] A. der W. M. F. (AWMF) Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), "Nationale VersorgungsLeitlinie - Chronische Herzinsuffizienz - Langfassung, 2. Auflage. Version 3 2017," *Äzq*, p. 147, 2017.
- [3] R. Larsen, "Herztransplantation," in *Anästhesie und Intensivmedizin in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017, pp. 211–220.
- [4] G. Drees and H. H. Scheld, "Die Herztransplantation," *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, vol. 25, no. S1, pp. 9–13, 2011.
- [5] N. Versorgungsleitlinie, "Chronische Herzinsuffizienz L a n g f a s s u n g," 2009.
- [6] L. H. Lund *et al.*, "The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Heart Transplantation Report—2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant," *J. Hear. Lung Transplant.*, vol. 35, p. online document, 2016.
- [7] U. Boeken and A. Lichtenberg, "Ist die Herztransplantation auch 2015 noch der therapeutische Goldstandard bei terminaler Herzinsuffizienz? TT - Heart Transplantation: Still Therapeutic Gold Standard for Patients with Advanced Heart Failure?," *Aktuel Kardiolog*, vol. 4, no. 03, pp. 160–168, 2015.
- [8] M. Strüber, A. L. Meyer, D. Malehsa, C. Kugler, A. R. Simon, and A. Haverich, "The current status of heart transplantation and the development of 'artificial heart systems' .," *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 106, no. 28–29, pp. 471–7, 2009.
- [9] S. Saito *et al.*, "Heart Transplant Recipients Enjoy Higher Health-related Quality of Life than Left Ventricular Assist Device Recipients," *Circulation*, vol. 132, no. Suppl 3, p. A13871 LP-A13871, Nov. 2015.
- [10] M. 2Washington U. S. of M. Merilda Blanco Guzman, MD; Erik R. Dubberke, MD, MSPH, FIDSA, FSHEA; Margaret a. Olsen, PhD, MPH; Justin Vader, MD, MPHS; David Raymer, MD; Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Washington University School of Medicine, St Louis, W. U. S. of M. St. Louis, MO; Infectious Diseases, and M. St. Louis, MO; Division Cardiovascular Medicine, Washington University School of Medicine, St Louis, MO; Division of Carviovascular Medicine, Washington University School of Medicine, St Louis, "Epidemiology of Initial and Recurrent Episodes of Infection in Left Ventricular Assist Device Recipients," *Open Forum Infect Dis* 3 1470, vol. 1, no. 5, pp. 6–11, 2016.
- [11] D. Pereda and J. V. Conte, "Left Ventricular Assist Device Driveline Infections," *Cardiology Clinics*, vol. 29, no. 4, pp. 515–527, 2011.

- [12] D. Esmore *et al.*, “VentrAssist (TM) left ventricular assist device: Clinical trial results and Clinical Development Plan update,” *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.*, vol. 32, no. 5, pp. 735–744, 2007.
- [13] Deutsche Stiftung Organtransplantation, “Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland,” p. 114, 2018.
- [14] A. Beckmann, R. Meyer, J. Lewandowski, A. Markewitz, and W. Harringer, “German Heart Surgery Report 2018 : The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery,” 2019.
- [15] R. Vacanti, J. P., Langer, “Tissue Engineering,” *Science (80-.)*, vol. 260, pp. 920–926, 1993.
- [16] J. J. Song and H. C. Ott, “Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds,” *Trends Mol. Med.*, vol. 17, no. 8, pp. 424–432, 2011.
- [17] J. Zhao, M. Griffin, J. Cai, S. Li, P. E. M. Bulter, and D. M. Kalaskar, “Bioreactors for tissue engineering : An update,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 109, pp. 268–281, 2016.
- [18] M. M. Stevens, R. P. Marini, D. Schaefer, J. Aronson, R. Langer, and V. P. Shastri, “In vivo engineering of organs: the bone bioreactor.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 32, pp. 11450–5, 2005.
- [19] S. a. Brigido, “The use of an acellular dermal regenerative tissue matrix in the treatment of lower extremity wounds: A prospective 16-week pilot study,” *Int. Wound J.*, vol. 3, no. 3, pp. 181–187, 2006.
- [20] S. Cebotari *et al.*, “Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells,” *Circulation*, vol. 114, no. SUPPL. 1, pp. 132–138, 2006.
- [21] B. E. Uygun *et al.*, “Decellularization and recellularization of whole livers.,” *J. Vis. Exp.*, no. 48, pp. 6–9, 2011.
- [22] H. C. Ott *et al.*, “Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung,” *Nat. Med.*, vol. 16, no. 8, pp. 927–933, 2010.
- [23] S. K. Goh *et al.*, “Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 28, pp. 6760–6772, 2013.
- [24] H. C. Ott *et al.*, “Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart.,” *Nat. Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 213–221, 2008.
- [25] E. a Ross *et al.*, “Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds.,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, no. 11, pp. 2338–2347, 2009.
- [26] A. Atala, S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo, and A. B. Retik, “Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty,” *Lancet*, vol. 367, no. 9518, pp. 1241–1246, 2006.

- [27] M. et al. Parmaksiz, "Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine," *Biomed. Mater.* 11, 2016.
- [28] S. R. Meyer *et al.*, "Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 130, no. 2, pp. 469–476, 2005.
- [29] A. Neumann *et al.*, "Early systemic cellular immune response in children and young adults receiving decellularized fresh allografts for pulmonary valve replacement," *Tissue Eng. Part A*, vol. 20, no. 0, pp. 1003–1011, 2014.
- [30] T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, and S. F. Badylak, "Decellularization of tissues and organs," *Biomaterials*, vol. 27, no. 19, pp. 3675–3683, 2006.
- [31] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak, "An overview of tissue and whole organ decellularization processes," *Biomaterials*, vol. 32, no. 12, pp. 3233–3243, 2011.
- [32] P. Akhyari, H. Kamiya, A. Haverich, M. Karck, and A. Lichtenberg, "Myocardial tissue engineering: the extracellular matrix," *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 34, no. 2, pp. 229–241, 2008.
- [33] S. L. K. Bowers, I. Banerjee, and T. a. Baudino, "The extracellular matrix: At the center of it all," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 474–482, 2010.
- [34] M. van der Rest and R. Garrone, "Collagen family of proteins," *FASEB J.*, vol. 5, no. 13, pp. 2814–2823, 1991.
- [35] J. P. Guyette, S. E. Gilpin, J. M. Charest, L. F. Tapias, X. Ren, and H. C. Ott, "Perfusion decellularization of whole organs," *Nat. Protoc.*, vol. 9, no. 6, pp. 1451–68, 2014.
- [36] L. E. De Castro Brás *et al.*, "Texas 3-Step decellularization protocol: Looking at the cardiac extracellular matrix," *J. Proteomics*, vol. 86, pp. 43–52, 2013.
- [37] E. Cimetta, A. Godier-Furnémont, and G. Vunjak-Novakovic, "Bioengineering heart tissue for in vitro testing," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 926–932, 2013.
- [38] H. Aubin *et al.*, "A novel native derived coronary artery tissue-flap model," *Tissue Eng. Part C. Methods*, vol. 19, no. 12, pp. 970–80, 2013.
- [39] S. F. Badylak *et al.*, "The Use of Extracellular Matrix as an Inductive Scaffold for the Partial Replacement of Functional Myocardium," vol. 15, pp. 29–40, 2006.
- [40] T. Eschenhagen and W. H. Zimmermann, "Engineering myocardial tissue," *Circ. Res.*, vol. 97, no. 12, pp. 1220–1231, 2005.
- [41] M. Tiburcy *et al.*, "Defined Engineered Human Myocardium with Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modelling and Repair," *Circulation*, p. CIRCULATIONAHA.116.024145, 2017.
- [42] W.-H. Zimmermann *et al.*, "Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts," *Nat. Med.*, vol. 12, no. 4, pp. 452–458, 2006.

- [43] V. Serpooshan *et al.*, “The effect of bioengineered acellular collagen patch on cardiac remodeling and ventricular function post myocardial infarction,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 36, pp. 9048–9055, 2013.
- [44] E. Entcheva, H. Bien, L. Yin, C. Y. Chung, M. Farrell, and Y. Kostov, “Functional cardiac cell constructs on cellulose-based scaffolding,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 26, pp. 5753–5762, 2004.
- [45] J. Leor *et al.*, “Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium?,” *Circulation*, vol. 102, no. 19 Suppl 3, pp. III56–I61, 2000.
- [46] R. K. Li *et al.*, “Construction of a bioengineered cardiac graft,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 119, no. 2, pp. 368–375, 2000.
- [47] Z. Li and J. Guan, “Hydrogels for cardiac tissue engineering,” *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 2, pp. 740–761, 2011.
- [48] M. Shin, O. Ishii, T. Sueda, and J. P. Vacanti, “Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 17, pp. 3717–3723, 2004.
- [49] J. Hülsmann *et al.*, “A novel customizable modular bioreactor system for whole-heart cultivation under controlled 3D biomechanical stimulation,” *J. Artif. Organs*, vol. 16, no. 3, pp. 294–304, 2013.
- [50] A. P. Price, K. a England, A. M. Matson, B. R. Blazar, and A. Panoskaltsis-Mortari, “Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, no. 8, pp. 2581–2591, 2010.
- [51] J. P. Guyette *et al.*, “Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix,” *Circ. Res.*, vol. 118, no. 1, pp. 56–72, 2016.
- [52] P. L. Sánchez *et al.*, “Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts,” *Biomaterials*, vol. 61, pp. 279–289, 2015.
- [53] M. Radisic, W. Deen, R. Langer, and G. Vunjak-Novakovic, “Mathematical model of oxygen distribution in engineered cardiac tissue with parallel channel array perfused with culture medium containing oxygen carriers,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 288, no. 3, pp. H1278–89, 2005.
- [54] M. J. Robertson, J. L. Dries-Devlin, S. M. Kren, J. S. Burchfield, and D. a. Taylor, “Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix,” *PLoS One*, vol. 9, no. 2, 2014.
- [55] G. Vunjak-Novakovic *et al.*, “Challenges in cardiac tissue engineering,” *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 16, no. 2, pp. 169–187, 2010.
- [56] C. Mas-Moruno, B. Garrido, D. Rodriguez, E. Ruperez, and F. J. Gil, “Biofunctionalization strategies on tantalum-based materials for osseointegrative applications,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 2, 2015.

- [57] W. Flameng, G. De Visscher, L. Mesure, H. Hermans, R. Jashari, and B. Meuris, "Coating with fibronectin and stromal cell-derived factor-1-alpha of decellularized homografts used for right ventricular outflow tract reconstruction eliminates immune response-related degeneration," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 147, no. 4, pp. 1398–1404.e2, 2014.
- [58] P. Akhyari *et al.*, "In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position," *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 38, no. 5, pp. 539–546, 2010.
- [59] G. Perri *et al.*, "Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction in patients with congenital heart disease," *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 41, no. 6, pp. 1320–1325, 2012.
- [60] P. Simon *et al.*, "Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT??? in pediatric patients," *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 23, no. 6, pp. 1002–1006, 2003.
- [61] M.-T. Kasimir *et al.*, "Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves.," *J. Heart Valve Dis.*, vol. 15, no. 2, pp. 278–86; discussion 286, 2006.
- [62] T. J. Keane, R. Londono, N. J. Turner, and S. F. Badylak, "Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response," *Biomaterials*, vol. 33, no. 6, pp. 1771–1781, 2012.
- [63] U. Galili, S. B. Shohet, E. Kobrin, C. L. Stults, and B. A. Macher, "Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 33, pp. 17755–17762, 1988.
- [64] J. M. Wainwright *et al.*, "Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart.," *Tissue Eng. Part C. Methods*, vol. 16, no. 3, pp. 525–532, 2010.
- [65] A. Weymann *et al.*, "Bioartificial Heart: A Human-Sized Porcine Model – The Way Ahead," *PLoS One*, vol. 9, no. 11, p. e111591, 2014.
- [66] P. Z. H. P. G. M. B. S. S. J. H. S. H. J. B. G. K. A. L. Akhyari, "A novel culture device for the evaluation of threedimensional extracellular matrix materials," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2012.
- [67] P. Akhyari *et al.*, "The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities.," *Tissue Eng. Part C. Methods*, vol. 17, no. 9, pp. 915–926, 2011.
- [68] J. Hülsmann *et al.*, "Mechanistics of biomass discharge during whole-heart decellularization," *Biomed. Mater.*, vol. 13, no. 3, 2018.
- [69] A. M. Seddon, P. Curnow, and P. J. Booth, "Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1666, no. 1–2, pp. 105–117, 2004.

- [70] P. F. Gratzer, R. D. Harrison, and T. Woods, "Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix.," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 10, pp. 2975–2983, 2006.
- [71] H. C. Lichstein and M. H. Soule, "Studies of the effect of sodium azide on microbic growth and respiration," *J. Bacteriol.*, vol. 47, no. 3, pp. 221–230, 1943.
- [72] R. P. Smith, C. a. Louis, R. Kruszyna, and H. Kruszyna, "Acute neurotoxicity of sodium azide and nitric oxide," *Toxicol. Sci.*, vol. 17, no. 1, pp. 120–127, 1991.
- [73] S. Chang and S. H. Lamm, "Human health effects of sodium azide exposure: a literature review and analysis.," *Int. J. Toxicol.*, vol. 22, no. 3, pp. 175–186, 2015.
- [74] a N. Pavlov, a a Anisimov, O. V Semyachkina-Glushkovskaya, E. G. Matasova, and J. Kurths, "Analysis of blood pressure dynamics in male and female rats using the continuous wavelet transform.," *Physiol. Meas.*, vol. 30, no. 7, pp. 707–717, 2009.
- [75] M. He and A. Callanan, "Comparison of methods for whole organ decellularisation in tissue engineering of bio-artificial organs," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 19, no. 3, p. 121019070753008, 2012.
- [76] A. Kadner *et al.*, "Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: A comparative study," *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 25, no. 4, pp. 635–641, 2004.
- [77] K. P. Chennazhy and L. K. Krishnan, "Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 26, no. 28, pp. 5658–5667, 2005.
- [78] V. Modur, G. a Zimmerman, S. M. Prescott, and T. M. McIntyre, "Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades.," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 22, pp. 13094–13102, 1996.
- [79] D. Kirchhofer, T. B. Tschopp, P. Hadvary, and H. R. Baumgartner, "Endothelial cells stimulated with tumor necrosis factor-?? express varying amounts of tissue factor resulting in inhomogenous fibrin deposition in a native blood flow system. Effects of thrombin inhibitors," *J. Clin. Invest.*, vol. 93, no. 5, pp. 2073–2083, 1994.
- [80] R. M. Kit, "For purification os total RNA from animal cells, animal tissues, bacteria, and yeast, and for RNA cleanup," *Mini Handb.*, no. September, pp. 3–80, 2010.
- [81] O. Mueller and A. Schroeder, "RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control Application," *Nano*, pp. 1–8, 2004.
- [82] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001.
- [83] 1* Stephen A. Bustin, 6 Vladimir Benes, 2 Jeremy A. Garson, 3, 4 Jan Hellemans, 5 Jim Huggett, 8 Mikael Kubista, 7, and 14 Reinhold Mueller, 9 Tania Nolan, 10 Michael W. Pfaffl, 11 Gregory L. Shipley, 12 Jo Vandesompele, 5 and Carl T. Wittwer13, "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments," *Clin. Chem.*, vol. 55, no. 4, 2009.

- [84] L. Yang, R. M. Froio, T. E. Sciuto, A. M. Dvorak, R. Alon, and F. W. Luscinskas, "ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow," *Blood*, vol. 106, no. 2, pp. 584–592, 2005.
- [85] R. Rothlein, M. L. Dustin, S. D. Marlin, and T. A. Springer, "A human intercellular adhesion molecule distinct from LFA-1," *J. Immunol.*, vol. 137, pp. 1270–1274, 1986.
- [86] J. M. Clements *et al.*, "Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin," *J. Cell Sci.*, vol. 107 (Pt 8), pp. 2127–2135, 1994.
- [87] M. R. Slowik, L. G. De Luca, W. Fiers, and J. S. Pober, "Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration," *Am. J. Pathol.*, vol. 143, no. 6, pp. 1724–1730, 1993.
- [88] M. W. Boehme *et al.*, "Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF- α and neutrophils: in vivo and in vitro studies," *Immunology*, vol. 87, no. 1, pp. 134–40, 1996.
- [89] F. Rechenmacher *et al.*, "A molecular toolkit for the functionalization of titanium-based biomaterials that selectively control integrin-mediated cell adhesion," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 19, no. 28, pp. 9218–9223, 2013.
- [90] C. Mas-Moruno, R. Fraioli, F. Albericio, J. M. Manero, and F. J. Gil, "Novel peptide-based platform for the dual presentation of biologically active peptide motifs on biomaterials," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 9, pp. 6525–6536, 2014.
- [91] C. Mas-Moruno *et al.*, "Behavior of primary human osteoblasts on trimmed and sand-blasted Ti6Al4V surfaces functionalized with integrin $\alpha_v\beta_3$ -selective cyclic RGD peptides," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 1, pp. 87–97, 2013.
- [92] J. H. Collier and T. Segura, "Evolving the use of peptides as components of biomaterials," *Biomaterials*, vol. 32, no. 18, pp. 4198–4204, 2011.
- [93] S. P. Massia and J. a Hubbell, "Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 25, no. 2, pp. 223–242, 1991.
- [94] T. H. Barker, "The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine," *Biomaterials*, vol. 32, no. 18, pp. 4211–4214, 2011.
- [95] S. P. Massia and J. a. Hubbell, "Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the IIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin $\alpha_5\beta_1$," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 20, pp. 14019–14026, 1992.
- [96] S. C. Heilshorn, K. a. DiZio, E. R. Welsh, and D. a. Tirrell, "Endothelial cell adhesion to the fibronectin CS5 domain in artificial extracellular matrix proteins," *Biomaterials*, vol. 24, no. 23, pp. 4245–4252, 2003.
- [97] A. Andukuri *et al.*, "Enhanced human endothelial progenitor cell adhesion and differentiation by a bioinspired multifunctional nanomatrix," *Tissue Eng. Part C. Methods*, vol. 19, no. 5, pp. 375–85, 2013.

- [98] J. E. Sadler, "Biochemistry and genetics of von Willebrand factor.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 67, pp. 395–424, 1998.
- [99] S. M. Albelda, W. a Muller, C. a Buck, and P. J. Newman, "Molecular and Cellular Properties of PECAM-1(endoCAM/CD31): A Novel Vascular Cell-Cell Adhesion Molecule," *J. Cell Biol.*, vol. 114, no. 5, pp. 1059–1068, 1991.
- [100] H. M. DeLisser *et al.*, "Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis.," *Am. J. Pathol.*, vol. 151, no. 3, pp. 671–677, 1997.
- [101] E. Wulf, a Deboen, F. a Bautz, H. Faulstich, and T. Wieland, "Fluorescent phallo-toxin, a tool for the visualization of cellular actin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 76, no. 9, pp. 4498–4502, 1979.
- [102] N. Guillen, F. Le Hegarat, A. Fleury, L. Hirschbein, and I. De Microbiologie, "Nucleic Acids Research," vol. 5, no. 2, pp. 475–489, 1978.
- [103] H. Aubin, A. Kranz, J. Hülsmann, A. Lichtenberg, and P. Akhyari, "Decellularized Whole Heart for Bioartificial Heart," in *Cellular Cardiomyoplasty: Methods and Protocols*, R. L. Kao, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 163–178.
- [104] G. R. Martin and H. K. Kleinman, "The extracellular matrix in development and in disease.," *Semin. Liver Dis.*, vol. 5, no. 2, pp. 147–156, 1985.
- [105] E. Lundgren, L. Terracio, S. Mårdh, and T. K. Borg, "Extracellular matrix components influence the survival of adult cardiac myocytes in vitro.," *Exp. Cell Res.*, vol. 158, no. 2, pp. 371–381, 1985.
- [106] S. Cebotari *et al.*, "Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: Early report," *Circulation*, vol. 124, no. 11 SUPPL. 1, pp. 115–124, 2011.
- [107] B. C. Karikkineth and W.-H. Zimmermann, "Myocardial tissue engineering and heart muscle repair.," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 4–11, 2013.
- [108] W. H. Zimmermann, I. Melnychenko, and T. Eschenhagen, "Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts," *Biomaterials*, vol. 25, no. 9, pp. 1639–1647, 2004.
- [109] T. Eschenhagen, M. Didié, F. Münzel, P. Schubert, K. Schneiderbanger, and W.-H. Zimmermann, "3D engineered heart tissue for replacement therapy.," *Basic Res. Cardiol.*, vol. 97 Suppl 1, pp. I146–I152, 2002.
- [110] W. H. Zimmermann *et al.*, "Heart muscle engineering: An update on cardiac muscle replacement therapy," *Cardiovasc. Res.*, vol. 71, no. 3, pp. 419–429, 2006.
- [111] H. Kitahara *et al.*, "Heterotopic transplantation of a decellularized and recellularized whole porcine heart," *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, vol. 22, no. 5, pp. 571–579, 2016.
- [112] J. J. Song *et al.*, "Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 92, no. 3, pp. 998–1006, 2011.
- [113] S. Sabetkish *et al.*, "Whole-organ tissue engineering : Decellularization and recellularization of three-dimensional matrix liver scaffolds," pp. 1498–1508, 2014.

- [114] M. E. Scarrit, "A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 3, no. March, pp. 1–17, 2015.
- [115] E. C. Novosel, C. Kleinhaus, and P. J. Kluger, "Vascularization is the key challenge in tissue engineering ☆," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 4–5, pp. 300–311, 2011.
- [116] S. T. M. Nillesen, P. J. Geutjes, R. Wismans, J. Schalkwijk, W. F. Daamen, and T. H. van Kuppevelt, "Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF," *Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 1123–1131, 2007.
- [117] X. Chen *et al.*, "Prevascularization of a Fibrin-Based Tissue Construct Accelerates the Formation of Functional Anastomosis with Host Vasculature," *Tissue Eng. Part A*, vol. Vol. 15, no. 6, 2008.
- [118] A. Assmann *et al.*, "Development of a growing rat model for the in vivo assessment of engineered aortic conduits," *J. Surg. Res.*, vol. 176, no. 2, pp. 367–375, 2012.
- [119] Y. Wang *et al.*, "Biomimetic Approach to Cardiac Tissue Engineering : Oxygen Carriers and Channeled Scaffolds," vol. 12, no. 8, 2006.
- [120] S. F. Badylak, D. Taylor, and K. Uygun, "Whole Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 13, p. 110301095218061, 2010.
- [121] M. Radisic, A. Marsano, R. Maidhof, Y. Wang, and G. Vunjak-Novakovic, "Cardiac tissue engineering using perfusion bioreactor systems," *Nat. Protoc.*, vol. 3, p. 719, Apr. 2008.
- [122] A. Neumann *et al.*, "Early Systemic Cellular Immune Response in Children and Young Adults Receiving Decellularized Fresh Allografts for Pulmonary Valve Replacement," *Tissue Eng. Part A*, vol. 20, no. 5–6, pp. 1003–1011, 2014.
- [123] X. Duan, C. McLaughlin, M. Griffith, and H. Sheardown, "Biofunctionalization of collagen for improved biological response: Scaffolds for corneal tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 28, no. 1, pp. 78–88, 2007.
- [124] A. Assmann *et al.*, "Acceleration of autologous invivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating," *Biomaterials*, vol. 34, no. 25, pp. 6015–6026, 2013.
- [125] A. de Mel, G. Jell, M. M. Stevens, and A. M. Seifalian, "Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: A review," *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 11, pp. 2969–2979, 2008.
- [126] H. Aubin *et al.*, "Customized interface biofunctionalization of decellularized extracellular matrix: towards enhanced endothelialization," *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 22, no. 5, pp. 496–508, 2016.
- [127] J. M. Wainwright *et al.*, "Preparation of Cardiac Extracellular Matrix from an Intact Porcine Heart," *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 16, no. 3, pp. 525–532, 2010.

- [128] A. Weymann *et al.*, “Development and Evaluation of a Perfusion Decellularization Porcine Heart Model,” *Circ. J.*, vol. 75, no. 4, pp. 852–860, 2011.
- [129] K. Schenke-Layland *et al.*, “Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves,” *J. Struct. Biol.*, vol. 143, no. 3, pp. 201–208, 2003.
- [130] R. Langer; J.P. Vacanti, “Tissue Engineering,” *Sci.* 1993;260920-6.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Originalaufbau der Dezellularisierungsanlage 2 und Schemazeichnung	17
Abb. 2:	Screenshot des Steuerungssystems und Drucküberwachung der Perfusionsanlage	18
Abb. 3:	Anordnung und Detailansicht des eigens konzipierten Schlauchsystems zur sterilen Befüllung und Wechsel des Perfusats während des Dezellularisierungsvorgangs.....	19
Abb. 4:	Disc System zur Biofunktionalisierung.....	20
Abb. 5:	Native, ovine Pulmonalklappe nach Präparation	24
Abb. 6:	Verschiedene Ansichten der eröffneten Pulmonalklappe nach der diffusionsbasierten Dezellularisierung mit Darstellung der Klappensegel	27
Abb. 7:	Re-endotheliale Wiederbesiedlung von <i>dECM</i> -Rattenherzen	33
Abb. 8:	Skizze des „Coronary Artery Tissue Flap Model“	34
Abb. 9:	AO (Aorta), LV (Linker Ventrikel), RV (Rechter Ventrikel), AP (Apex), S (Septum);	35
Abb. 10:	Peptidaufbau Schema	41
Abb. 11:	Molekularer Aufbau der verwendeten synthetischen Peptide	42
Abb. 12:	Ovine Pulmonalklappensegelpräparation	43
Abb. 13:	(1-4) Quadranteneinteilung bei der Aufnahme eines einzelnen Klappensegels	47
Abb. 14:	Darstellung der Auswertungsmethode via Image J.....	49
Abb. 15:	<i>In toto</i> dezellularisiertes ovines Herz	50
Abb. 16:	DAPI-Färbung von <i>dECM</i> nach Re-Endothelialisierung mittels <i>HUVECs</i>	57
Abb. 17:	H.E.-Färbung von <i>dECM</i> nach Re-Endothelialisierung mittels <i>HUVECs</i>	58
Abb. 18:	MOVAT Färbung von <i>dECM</i> nach Re-Endothelialisierung mittels <i>HUVEC</i>	59
Abb. 19:	Darstellung der re-endothelialisierten Gefäßarchitektur eines <i>dECM Tissue Flap</i>	61
Abb. 20:	Nachweis funktioneller Aktivität von <i>HUVECs</i> nach Re-endothelialisierung eines <i>dECM Tissue Flap</i> durch vWF-Ausschüttung im Gefäßsystem	62

Abb. 21:	Nachweis funktioneller Aktivität von <i>HUVECs</i> nach Re-endothelialisierung eines <i>dECM Tissue Flap</i> durch Endothelmarker CD31 im Gefäßsystem	63
Abb. 22:	Darstellung des Zytoskelett re-endothelialisierter <i>HUVECs</i> durch Phalloidin-Färbung	64
Abb. 23:	RNA-Gehalt und zugehörige RIN-Werte <i>HUVECs</i> im 2-D-Modell	65
Abb. 24:	RNA-Gehalt und zugehörige RIN Werte <i>HUVECs</i> im 3-D-Modell.....	65
Abb. 25:	Relative Genexpression von Thrombomodulin	66
Abb. 26:	Relative Genexpression von Tissue Factor.....	67
Abb. 27:	Relative Genexpression von ICAM-1	68
Abb. 28:	Relative Genexpression von E-Selectin	68
Abb. 29:	Relative Genexpression von VCAM-1	69
Abb. 30:	Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung durch Fluoreszenzmarkierung der Peptidbeschichtung von ovinen Pulmonalklappensegel <i>dECM</i>	70
Abb. 31:	Direkter Vergleich der AoC nach 1 h Besiedlungszeit	71
Abb. 32:	Direkter Vergleich der AoC nach 4 h Besiedlungszeit	73
Abb. 33:	Zelladhäsionsstudie nach Oberflächenfunktionalisierung von ovinen Pulmonalklappen <i>dECM</i>	74
Abb. 34:	Repräsentative Aufnahmen ovines Herz während eines inkompletten <i>in toto</i> Dezellularisierungsversuchs	76
Abb. 35:	Repräsentative Aufnahmen natives ovines Herz nach DAPI-Färbung	77
Abb. 36:	Repräsentative Aufnahmen von Zellrückständen innerhalb der ovinen <i>dECM</i> mittels DAPI-Färbung	78
Abb. 37:	Repräsentative Aufnahmen ovine <i>dECM</i> und Nativaufnahmen in H.E. Färbung	79
Abb. 38:	Repräsentative Aufnahmen ovine <i>dECM</i> und Nativaufnahmen in MOVAT-Färbung	80
Abb. 39:	Erfolgreiche vollständige <i>in toto</i> Dezellularisierung eines ovinen Herzens.....	81
Abb. 40:	Repräsentative histologische Aufnahmen einer perfusionsbasierten ovinen <i>in toto</i> Herzdezellularisierung nach DAPI-Färbung.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Dezellularisierungsprotokoll Rattenherz	29
Tabelle 2:	Dezellularisierungsprotokoll der perfusionsbasierten <i>in toto</i> Dezellularisierung von ovinen Herzen	29
Tabelle 3:	Dezellularisierungsprotokoll der diffusionsbasierten Dezellularisierung oviner Pulmonalklappen	30
Tabelle 4:	Zusammensetzung und Bestandteile des verwendeten Endothelzellmediums ...	31
Tabelle 5:	Verwendeter Probenansatz und Zusammensetzung zur Real-Time qPCR	38
Tabelle 6:	Vollständige Liste der Zielgene und den zugehörigen Basenfolgen der verwendeten Primer	40
Tabelle 7:	Übersicht über den Versuchsaufbau und die Versuchsgruppen	45
Tabelle 8:	Übersicht der Arbeitslösungen und deren spezifische Zusammensetzung zur MOVAT-Färbung	53
Tabelle 9:	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse des <i>in vitro</i> Zelladhäsionsversuch nach 1 h Besiedlungszeit	72
Tabelle 10:	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse des <i>in vitro</i> Zelladhäsionsversuch nach 4 h Besiedlungszeit	73

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg bedanken, der als Direktor der Klinik mit großem Interesse die Forschungsarbeit mit seiner langjährigen Erfahrung, durch wertvolle Anregungen und Ratschläge, stets unterstützt hat.

Der größte Dank gilt meinem Doktorvater und wissenschaftlichen Betreuer PD Dr. med Hug Aubin, der mich in die Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Nur durch seinen Überblick über das weitreichende und sich ständig weiterentwickelnde Forschungsgebiet war es letztlich möglich das Forschungskonzept dieser Dissertation ständig zu verbessern und mit Erfolg abzuschließen. Für die fortwährend freundschaftliche und geduldige Art, sei es von den Anfängen - geprägt von intensiver Einarbeitung in die praktische Laborarbeit – über die zahlreichen richtungsweisenden Ratschläge bis zur Korrektur der Promotionsschrift, bedanke ich mich von ganzem Herzen.

Weiter möchte ich Prof. Dr. med. Payam Akhyari danken, der als Leiter der Forschungsgruppe für Experimentelle Chirurgie über das gesamte Promotionsvorhaben hinweg mit zahlreichen Anregungen, Vorschlägen und fruchtbaren Diskussionen ebenfalls einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte.

Besonderen Dank gebührt Dr. rer. nat. Mareike Barth für die außerordentlich kompetente und unkomplizierte Hilfestellung in der Lernphase und Evaluation bei einer Vielzahl der verwendeten Methoden.

Ebenso gilt dies für Dr. rer. nat. Jörn Hülsmann, von dem ich innerhalb der Einarbeitung und der weiteren Supervision nicht nur im Bereich der Organdezellularisierung und Zellkulturarbeit im Rahmen der engen Zusammenarbeit viele entscheidende Dinge lernen durfte, welche die Ergebnisse der Arbeit entscheidend geprägt haben.

Danken möchte ich auch Frau Gisela Müller, die als medizinisch technische Assistentin unverzichtbar für die Produktivität des gesamten Labors und das Gelingen zahlreicher Versuche dieser Arbeit war.

Meinen zahlreichen Mitdoktoranden danke ich für die Hilfsbereitschaft und den Zusammenhalt untereinander, der die oft langen Stunden im Labor kurzweiliger und vergnüglicher gemacht haben. Namentlich möchte ich hier Dr. med. Alexander Kranz erwähnen, der mir mehr als einmal seine Zeit geopfert hat. Um mir sein theoretisches und praktisches Wissen, der eigenen Methoden, uneigennützig weiterzugeben.

Von ganzem Herzen möchte ich auch meinen Eltern und Großeltern danken, durch ihre großzügige und bedingungslose Unterstützung in allen Belangen war es überhaupt erst möglich sich vollständig auf das Medizinstudium und das Erarbeiten und Verfassen dieser Arbeit zu konzentrieren. Herzlichster Dank gebührt zu guter Letzt meiner Frau Laura, die mich über alle Jahre der Arbeit aufopferungsvoll unterstützt, motiviert und begleitet hat.