

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Christian Hagl

**Systematische Evaluation und Optimierung physikalischer und
prozeduraler Dezellularisationsmethoden
zur Herstellung xenogener Gewebeprothesen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Fabian Starnecker

aus

Bad Reichenhall

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Hagl
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Haas
Prof. Dr. med. Bruno Meiser
Prof. Dr. med. Christian Schulz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Nikolaus Thierfelder

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.2019

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	KURZZUSAMMENFASSUNG	06
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	08
3	EINLEITUNG	10
3.1	Moderne Chirurgie: Die Suche nach dem optimalen Gewebeersatz	10
3.2	Klassische Implantattypen	11
3.2.1	Synthetische Implantate	11
3.2.2	Biologische Implantate	13
3.3	Dezellularisation als Alternative	14
3.3.1	Definition und Anwendung der Dezellularisation	14
3.3.2	Dezellularisationsmethoden	18
3.3.3	Dezellularisation in der Herzchirurgie	20
3.4	Ziel der Arbeit	22
4	MATERIAL UND METHODEN	23
4.1	Materialvorbereitung	23
4.2	Dezellularisation	24
4.2.1	Dezellularisationslösung	24
4.2.2	Orbitaler Schüttel-Inkubator	24
4.2.3	Flussdezellularisation	25
4.2.4	Flussdezellularisation und Ultraschallbehandlung	27
4.2.5	Inkubationsprotokolle	29
4.2.6	Weiterentwicklung	30
4.3	Weiterverarbeitung der Proben	32
5	AUSWERTUNG	33
5.1	Histologische Probenaufarbeitung	33
5.1.1	Probengewinnung	33
5.1.2	Paraffinschnitte	33
5.1.3	Entparaffinierung	34
5.2	DAPI Fluoreszenz	36
5.2.1	Allgemeines	36
5.2.2	Färbeprotokoll	36
5.2.3	Mikroskopie	37
5.3	Hämatoxylin-Eosin	38
5.3.1	Allgemeines	38
5.3.2	Färbeprotokoll und Mikroskopie	39
5.4	Movat Pentachrom	40
5.4.1	Allgemeines	40
5.4.2	Färbeprotokoll und Mikroskopie	40
5.5	Pikro-Siriusrot	42
5.5.1	Allgemeines	42

5.5.2	Färbeprotokoll und Mikroskopie	42
5.6	Probenlagerung	43
5.7	Rasterelektronenmikroskopie	44
5.7.1	Allgemeines	44
5.7.2	Probenvorbereitung	45
5.7.3	Mikroskopie	46
5.8	Statistische Auswertung	47
6	ERGEBNISSE	48
6.1	pH-Messwerte	48
6.2	DAPI Fluoreszenz	49
6.2.1	Nativproben	49
6.2.2	Behandelte Proben	49
6.3	Hämatoxylin-Eosin	55
6.3.1	Nativproben	55
6.3.2	Behandelte Proben	56
6.4	Movat Pentachrom	58
6.4.1	Nativproben	58
6.4.2	Behandelte Proben	59
6.5	Pikro-Siriusrot	62
6.5.1	Nativproben	62
6.5.2	Behandelte Proben	63
6.6	Rasterelektronenmikroskopie	65
6.6.1	Nativproben	65
6.6.2	Behandelte Proben	66
7	DISKUSSION	70
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	79
9	LITERATURVERZEICHNIS	81
10	ANHANG	99
	VORVERÖFFENTLICHUNGEN	109
	DANKSAGUNG	110

1 KURZZUSAMMENFASSUNG

Während der vergangenen Jahre hat die Verwendung dezellularisierter Gewebeprothesen in der Medizin kontinuierlich zugenommen. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden ausgewählte physikalische und prozedurale Methoden zur Dezellularisation (DZ) biologischer Gewebe systematisch untersucht und bewertet.

72 Aortenwände (AW) frischer Schweineherzen wurden dafür in drei verschiedenen Gruppen einer chemischen Dezellularisationslösung, bestehend aus je 0,5 % Natriumdeoxycholat und Natriumdodecylsulfat, für 4 h oder 8 h ausgesetzt. Die Inkubation fand entweder kontinuierlich oder in repetitiven Behandlungszyklen statt. Ein Zyklus bestand dabei aus je 2 h chemischer Behandlung gefolgt von einem 30 min Waschvorgang mit Natriumchlorid-Lösung (NaCl). Während der Prozeduren befanden sich die AW entweder in einem konventionellen Schüttel-Inkubator oder wurden einer zirkulären Strömungsbewegung im Sinne einer Flussdezellularisation ausgesetzt. Zusätzlich zur Flussdezellularisation wurde ein Teil der AW mit Ultraschallwellen behandelt. Nach Abschluss der DZ durchliefen alle AW zehn repetitive 15 min Waschschritte mit NaCl. Basierend auf der Annahme, dass erfolgreiche DZ gleichzusetzen ist mit der Abwesenheit von Zellkernen bei gleichzeitigem Erhalt intakter Extrazellulärmatrix (EZM), wurde die Auswertung der DZ Ergebnisse durchgeführt. Diese erfolgte mithilfe fluoreszenz-, licht-, und rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen der Proben. Die Effektivität der DZ wurde dabei anhand der zur Probenoberfläche erreichten Eindringtiefen (EDT) an DNA-Eradikation in Färbungen mit 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Hämatoxylin-Eosin bewertet. Zur Beurteilung der EZM dienten die Bindegewebsfärbungen Movat Pentachrom und Pikro-Siriusrot sowie die Rasterelektronenmikroskopie (REM).

Generell waren die nach 4 h und 8 h eruierten EDT der äußeren Oberflächen der AW signifikant höher als die der lumenseitigen Oberflächen ($64 \pm 22\%$, $p < 0,001$). Darüber hinaus konnte eine signifikante Zeitabhängigkeit der EDT sowohl an äußerer ($78 \pm 36\%$, $p < 0,001$) als auch innerer Oberfläche ($85 \pm 58\%$, $p < 0,001$) gezeigt werden. Verglichen mit der kontinuierlichen Schüttelmethode führte der Einsatz von zyklischen Inkubationsschemata (Maximum: 43 %, $p < 0,001$), Flussbewegung (Maximum: 19 %, $p < 0,05$) und Ultraschall (Maximum: 49 %, $p < 0,001$) zu signifikant höheren EDT. Der Erhalt der physiologischen Gewebekomposition sowie des kollagenen Fasernetzwerkes

der EZM wurde für alle Versuchsproben mithilfe der histologischen Bindegewebsfärbungen bewiesen. Die Auswertung der REM-Aufnahmen zeigte ein skelettiertes, aber intaktes Fasernetzwerk der AW.

Basierend auf den gewonnenen Ergebnissen wurden 6 AW für 24 h zyklisch Flussdezellularisation und intermittierender Ultraschallbehandlung ausgesetzt. Als Vergleichskollektiv hierzu wurden 6 AW im Schüttelinkubator ebenfalls für 24 h behandelt. Die Auswertung dieser beiden Gruppen bestätigte die vorherigen Ergebnisse. So führten auch hier intermittierende Waschschriffe, Flussbewegung und Ultraschallexposition zu signifikant höheren EDT an äußerer (30 %, $p < 0,001$) und innerer Oberfläche (23 %, $p < 0,001$). Darüber hinaus konnten an den äußeren Oberflächen der AW erneut höhere EDT ($45 \pm 18\%$, $p < 0,001$) verzeichnet, sowie die bereits postulierte Zeitabhängigkeit der EDT bestätigt werden. Hierbei zeigte sich auch, dass die Eindringgeschwindigkeit mit zunehmender Expositionszeit abnahm. Dies wurde im Sinne einer mit steigender EDT verminderten Effektivität der Behandlungsprozedur erklärt. Histologische und REM Aufnahmen lieferten in den 24 h behandelten Proben ebenfalls keine Hinweise auf prozessbedingte Schäden der Gewebestruktur.

Zusammenfassend erlaubte unsere systematische Evaluation entscheidende Faktoren für effektivere DZ Prozeduren zu identifizieren und zu beurteilen. Basierend auf unseren Ergebnissen empfehlen wir für zukünftige DZ Protokolle ausdrücklich die Verwendung von zyklischen Inkubationsschemata sowie eine Kombination aus Flussdezellularisation und Ultraschallbehandlung.

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Einheiten:

Abkürzung	Bedeutung
bar	Physikalische Druckeinheit Bar
bpm	beats per minute/ Schläge pro Minute
g	Gramm
Gew.-%	Gewichtsprozent
h	hour/ Stunde
l	Liter
mA	Milliampere
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
n	Anzahl
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
sek	Sekunde
V	Volt
Vol.-%	Volumenprozent
W	Watt
°C	Grad Celsius

Allgemeine Begrifflichkeiten:

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AD	Aqua destillata
AW	Aortenwand
bp	base pairs/ Basenpaare
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-diamidin-2-phenylindol
d _i	Innendurchmesser
DNA dsDNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure double-stranded DNA = doppelsträngige DNA
DZ	Dezellularisation
EDT	Eindringtiefe
EDT _i	Eindringtiefe an der Innenoberfläche (=luminal)
EDT _a	Eindringtiefe an der Außenoberfläche
EZM	Extrazellulärmatrix
G _c	Kontrollgruppe = Schüttel-Inkubator
G _{c-24h}	Kontrollgruppe 24 h = Schüttel-Inkubator
G ₁	Gruppe 1 = Flussdezellularisation
G ₂	Gruppe 2 = Flussdezellularisation und Ultraschallbehandlung
G ₃	Gruppe 3 = modifizierte Kombination Flussdezellularisation und Ultraschallbehandlung
H&E	Hämatoxylin-Eosin
MPC	Movat Pentachrom
NaCl	Natriumchlorid-Lösung
Nr.	Nummer
Patienten	Patientinnen und Patienten
PBS	phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Saline
PSR	Pikro-Siriusrot
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SD	Sodiumdeoxycholat/ Natriumdeoxycholat
SDS	Sodiumdodecylsulfat/ Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle

3 EINLEITUNG

3.1 Moderne Chirurgie: Die Suche nach dem optimalen Gewebeersatz

Die Chirurgie (von altgriechisch: cheiros = Hand und ergon = Arbeit) gilt als die älteste Disziplin der Medizin. Erste Überlieferungen über chirurgische Handlungen stammen bereits aus der Steinzeit. Zu Beginn beschränkten sich diese Aktivitäten vor allem auf die konservative Versorgung von Wunden und Frakturen. Erst nach und nach wurden erste invasive Eingriffe wie Beschneidung, Blasensteinentfernung und Schädeltrepanation entwickelt. [1, 2] Bis in die frühe Neuzeit verstand sich die Chirurgie anschließend vor allem auf die Fortentwicklung der Wundversorgung sowie die Entfernung unerwünschter Geschwüre und verletzter Extremitäten. [1] Erst in den vergangenen Jahrhunderten erweiterte sich das Verständnis der Chirurgie um einen regenerativen und rekonstruktiven Aspekt. So wurde zunehmend versucht, die Struktur und Funktion entfernter oder dysfunktionaler Körperteile durch Ersatzmaterialien (=Prothesen) wiederherzustellen. [3] Zur Fertigung dieser bediente man sich zunächst einfacher Materialien wie Holz und Eisen. Aufgrund begrenzter operativer Möglichkeiten und damit einhergehender Blutungs- und Infektionsrisiken wurden Prothesen bis in das 19. und 20. Jahrhundert hauptsächlich außerhalb des Körpers verwendet. Diese sogenannten Exoprothesen wurden vor allem zu orthopädischen Zwecken eingesetzt. [4] Erst im Jahre 1890 gelang es dem Berliner Chirurgen Themistocles Gluck im Rahmen eines Kniegelenkersatzes die erste im Körperinneren platzierte Prothese (=Endoprothese) zu implantieren. [5] Infolge des technischen Fortschritts erlebte die Entwicklung synthetischer Implantat-Materialien ab Mitte des 20. Jahrhunderts starken Aufschwung. In Kombination mit verbesserten operativen Techniken führten die neuen Prothesenmaterialien dazu, dass neben der Orthopädie auch Fachrichtungen wie die Augenheilkunde, Gynäkologie und Gefäßchirurgie vermehrt die Möglichkeiten des synthetischen Gewebeersatzes nutzten. [4, 6-8] Etwa zeitgleich zur Entstehung der synthetischen Endoprothetik begann auch die Verwendung biologischer Gewebe als Implantate. Bereits 1883 übertrug der Berliner Chirurg Theodor Kocher menschliches Schilddrüsengewebe auf einen zuvor schilddrüsenentfernten Patienten. Retrospektiv gesehen begründete Kocher damit die moderne Organtransplantation. [9] Etwas mehr als 20 Jahre später gelang die erste erfolgreiche Transplantation einer menschlichen Spenderhornhaut. Zuvor waren zahlreiche Versuche mit tierischen und gläsernen

Hornhaut-Prothesen gescheitert. [10] Die zunehmenden Erfolge biologischer Implantate waren maßgeblich neuen Erkenntnissen der Immunologie und darauf basierender Behandlungsstrategien zu verdanken. [11] Diese ermöglichten es schließlich dem amerikanischen Chirurgen Joseph E. Murray 1954 die erste erfolgreiche Nierentransplantation an einem Menschen durchzuführen. [12] Wenige Jahre später konnten beim Ersatz menschlicher Herzklappen erstmalig biologische Prothesen als Alternative zu synthetischen Implantaten angeboten werden. [13] Weitere Beispiele erfolgreicher Anwendungen biologischer Implantate lassen sich auch in der modernen Gefäßchirurgie finden. [14, 15]

Zusammenfassend wurde im vergangenen Jahrhundert der Grundstein für den modernen Gewebe- beziehungsweise Organersatz gelegt. Dieser kann klassischerweise mittels synthetischer oder biologischer Materialien erfolgen. Neben der stetigen Weiterentwicklung dieser konventionellen Implantate werden seit einigen Jahren neue Wege der Implantat-Herstellung erforscht. Dabei gelten die Prozesse der Dezellularisation (DZ) als eine vielversprechende Alternative. Langfristig wird dadurch die Herstellung verbesserter biologischer Gewebe- und Organprodukte angestrebt. [16, 17]

3.2 Klassische Implantattypen

3.2.1 Synthetische Implantate

Sowohl chirurgische als auch internistische Fachdisziplinen bedienen sich heutzutage einer Vielzahl an synthetischen Implantaten. Als Beispiele hierzu können orthopädische Endo- und Exoprothesen, Gefäß-Stent-Prothesen, synthetische Herzklappen und rekonstruktiv-plastische Prothesen genannt werden. [18-22] Dank der Verwendung robuster Materialien zeichnen sich synthetische Implantate in der Regel durch lange Haltbarkeit aus. So bleiben beispielsweise synthetische Herzklappen nach Implantation meist ein Leben lang funktionstüchtig und können damit risikoreicher Folgeeingriffe entbehren. [21] Auch interventionell eingesetzte Stent-Graft-Prothesen der Aorta gelten ersten Langzeitstudien entsprechend als dauerhaft haltbar. [23] Ein weiterer Vorteil synthetischer Implantate ist deren gute Verfügbarkeit dank standardisierter, industrieller Fertigungsprozesse. Dies ermöglicht unter anderem die seit Jahren

steigenden Zahlen an orthopädischen Gelenkersatzoperationen. So wurden in Deutschland allein im Jahr 2011 bereits über 220.000 Hüftprothesen implantiert. [18] Neben diesen Vorteilen weisen synthetische Implantate jedoch auch eine Reihe gemeinsamer Nachteile auf. So wird jede synthetische Prothese im menschlichen Organismus als Fremdkörper angesehen. Dies kann – abhängig vom jeweiligen Implantat – verschiedene Komplikationen und Therapiekonsequenzen mit sich bringen. So gelten beispielsweise in der Orthopädie Prothesen-Infektionen als eine nach wie vor nicht vollständig zu vermeidende Komplikation. [24] Hierbei spielt die durch die Oberflächen der synthetischen Materialien begünstigte Biofilmbildung eine entscheidende Rolle. Im schlimmsten Falle müssen Implantate infolge von Infektionen frühzeitig gewechselt werden. [25] Neben klassischen Infektionen gelten auch Fibrosen als typische Komplikation nach Implantation synthetischer Materialien. Diese entstehen als Reaktion auf den implantierten Fremdkörper und können langfristig ebenfalls bis hin zur Notwendigkeit einer operativen Revision führen. Dies spielt unter anderem in der plastischen Chirurgie eine bedeutende Rolle. [26] Als weiteres Beispiel Implantatbedingter Komplikationen gelten Thromboembolien nach synthetischem Herzklappenersatz. Als Ursache hierfür wird die hohe Thrombogenität synthetischer Oberflächenmaterialien verantwortlich gemacht. Zur Vermeidung dieser Komplikation sind synthetische Herzklappenprothesen zwingend an eine lebenslange medikamentöse Antikoagulation gekoppelt. [27] Neben diesen Fremdkörper-bedingten Risiken, weisen synthetische Implantate einen weiteren gemeinsamen Schwachpunkt auf. So sind sie nach wie vor nicht in der Lage, die biomechanischen Eigenschaften nativer Gewebe vollständig zu ersetzen. Werden beispielsweise Teile der Aorta ascendens mithilfe synthetischer Prothesen ersetzt, so fehlt in diesen Bereichen fortan die Windkesselfunktion. Infolgedessen kann es zu Veränderungen der verbliebenen nativen Aorta und zu zusätzlichen Operationsindikationen kommen. [28] Auch orthopädische Knochenersatzmaterialien sind bisher nicht in der Lage, die mechanischen Eigenschaften natürlichen Knochens vollständig zu ersetzen. Dies äußert sich in veränderten elastischen Eigenschaften und einer erhöhten Frakturgefahr des Knochenersatzes. Zur Überwindung all dieser aktuellen Nachteile befinden sich synthetische Implantate nach wie vor in einem stetigen Prozess der Verbesserung. [29]

3.2.2 Biologische Implantate

Biologische Implantate werden heutzutage unter anderem im Rahmen von Organtransplantationen verwendet. In Deutschland werden Hornhaut- Herz-, Lungen-, Nieren-, Leber-, Pankreas- und Dünndarmtransplantationen durchgeführt. Der große Vorteil biologischer Gewebe liegt hierbei in der Fähigkeit zur vollständigen Übernahme aller Organfunktionen. [30-32] Neben dem Ersatz ganzer Organe werden biologische Implantate auch für die Rekonstruktion und den Austausch einzelner Organteile verwendet. Ein Beispiel hierfür ist die Transplantation patienteneigener oder -fremder Blutgefäße im Rahmen von Bypassoperationen. Dabei werden arterielle oder venöse Blutgefäße zur Perfusionsverbesserung eines Organgebietes transplantiert. [33, 34] Ein weiteres Anwendungsgebiet biologischer Implantate stellt die Korrektur von Herzklappenerkrankungen dar. Dabei werden sowohl patienteneigene Herzklappen (Autograft), als auch Implantate aus Leichen- (Allograft/ Homograft), und tierischem Material (Xenograft) verwendet. Dank ihrer natürlichen Oberflächenbeschaffenheit erzielen diese Implantate hämodynamische Ergebnisse, welche nativen Klappen vergleichbar sind. Darüber hinaus entfällt im Gegensatz zu synthetischen Prothesen die Notwendigkeit einer dauerhaften Antikoagulation. [35-37] Trotz des Vorteils der Strukturähnlichkeit beziehungsweise -gleichheit zum zu ersetzenden Gewebe, sind auch biologische Implantate mit Nachteilen behaftet. So werden diese nach Implantation – ähnlich wie synthetische Prothesen – als Organismus-fremd erkannt und lösen Abwehrreaktionen aus. [38] Besonders stark ausgeprägt sind diese immunologischen Prozesse nach Organtransplantationen. Folglich müssen organtransplantierte Patienten zum Schutz der Implantate lebenslang immunsupprimiert werden. Als Nebenwirkung der dauerhaften medikamentösen Behandlung können schwerwiegende Folgeerkrankungen auftreten. Diese betreffen sowohl innere Organe als auch die Haut der Patienten und können langfristig die Lebenserwartung deutlich einschränken. [39, 40] Weniger komplexe Implantate wie biologische Herzklappen erfordern in der Regel dank spezifischer Vorbehandlungsprozeduren keine dauerhafte Immunsuppression. [35] Nichtsdestotrotz bedingen die immunologischen Abwehrreaktionen auch hier Nachteile der Implantate. So ist aufgrund immunogen bedingter Verschleißprozesse die Haltbarkeit biologischer im Vergleich zu synthetischen Herzklappen deutlich verkürzt. Auch heutzutage noch liegt die mittlere Lebensdauer biologischer Herzklappenprothesen bei lediglich 15-20 Jahren. [41] Neben dem für alle biologischen Implantate gültigen Problem der immunologischen Abwehrprozesse ist für

Organtransplantate darüber hinaus die Schwierigkeit der Beschaffung zu nennen. Eine wie für synthetische Implantate beschriebene industrielle Herstellung ist hier aktuell nicht möglich. Folglich ist man zur Gewinnung dieser Implantate auf Organspenden angewiesen. Da die Zahlen an Organspendern seit Jahren kontinuierlich sinken, werden zunehmend weniger Organe transplantiert. So wurden im Jahr 2016 bundesweit nur mehr 3708 Organe transplantiert. Fünf Jahre zuvor waren es noch 5084 Organe gewesen. [32]

Zusammenfassend bieten biologische Materialien die Möglichkeit, Gewebe und Organe funktionell vollständig zu ersetzen. Der erfolgreiche Einsatz biologischer Implantate wird jedoch durch immunologische Abwehrreaktionen sowie Materialmangel erschwert. Langfristig könnten die Prozesse der DZ zur Behebung dieser Probleme beitragen und dadurch die Anwendungsgebiete biologischer Implantate erweitern.

3.3 Dezellularisation als Alternative

3.3.1 Definition und Anwendung der Dezellularisation

Die Prozesse der DZ zielen auf eine Trennung der nativen Einheit aus Zellen und dazugehöriger Extrazellulärmatrix (EZM) ab. [42] Dabei sollen, durch Entfernung sämtlicher zellulärer Komponenten, azelluläre, dreidimensionale EZM Konstrukte hergestellt werden. [16, 43-45] Diese Matrixgebilde können anschließend als dezellularisierte Gewebeprothesen implantiert und in vivo re-besiedelt und re-modelliert werden. [46] Alternativ können die Matrixprodukte als Zellträgergerüste (Scaffolds) im Rahmen von Prozessen des sogenannten Tissue Engineerings zunächst in vitro mit Zellen kultiviert und anschließend implantiert werden. [47-49] Dezellularisierte Gewebe sollen sich gegenüber klassischen biologischen Materialien durch einen entscheidenden Vorteil auszeichnen: Native biologische Gewebe werden bei Implantation in einen neuen Organismus vom Empfängerimmunsystem als fremd erkannt und lösen Abwehrreaktionen aus. Als Ausgangspunkt der immunologischen Reaktionen gelten die zellulären Gewebestandteile. [50] Werden diese zellulären Antigene vor Implantation im Rahmen einer DZ entfernt, so wird das Gewebe selbst bei xenogenem Ursprung vom Empfängerimmunsystem toleriert. Die Prozesse der DZ versprechen somit die Herstellung immunogen inerter und dadurch weniger

komplikationsträchtiger Implantate. [45, 50, 51] Dadurch könnten die Nachteile klassischer biologischer Implantate wie verkürzte Haltbarkeit und frühzeitige Implantat-Abstoßung vermieden werden. [52, 53] Gegenüber synthetischen Implantaten bestechen dezellularisierte Matrixprodukte vor allem durch ihre biomechanischen Eigenschaften. Die mechanische Stabilität nativer Gewebe wird zu einem Großteil von der EZM bestimmt. Darüber hinaus werden auch biologische Gewebeeigenschaften in entscheidendem Maße durch die EZM beeinflusst. Dabei bietet die EZM ein gewebespezifisches Mikromilieu, welches in ständiger Wechselwirkung mit den Zellen steht und diesen ein adaptives Umfeld für Migration, Proliferation, und Differenzierung bietet. [16, 54-59] Diesen Aussagen entsprechend sollten dezellularisierte EZM Produkte nicht nur dieselben mechanischen Eigenschaften wie das zu ersetzende Gewebe, sondern auch ideale Bedingungen für Re-Besiedlungsprozesse bieten. [43-45, 60]

Zusammenfassend verspricht die DZ die Herstellung immunogen inerter, biologischer EZM Produkte. Diese sollen sich dank nativer biomechanischer Eigenschaften sowie Abwesenheit immunogen bedingter Komplikationen klassischen synthetischen und biologischen Implantattypen überlegen zeigen.

Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden, müssen DZ Prozesse zwei Hauptanforderungen erfüllen: Zum einen müssen die DNA und alle weiteren zellulären Antigene, welche Immunreaktionen auslösen können, entfernt werden. Zum anderen müssen die Bestandteile der EZM mitsamt ihrer Anreizsignale für Re-Besiedlung sowie ihrer Bedeutung für die mechanische Stabilität des Gewebes erhalten bleiben. [54, 61] Nur die Erfüllung beider Ansprüche sollte als erfolgreiche DZ bezeichnet werden. [16] Hierbei ist anzumerken, dass die Definition der Entfernung sämtlicher zellulärer Bestandteile nach wie vor Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen ist. So ist anerkannt, dass zelluläre Residualkomponenten nach abgeschlossener DZ Prozedur zu Immunreaktionen des Empfängers und damit zu schlechteren funktionellen Ergebnissen führen können. [50, 62, 63] Es ist jedoch umstritten ob generell bei jeglicher Menge an Residualzellen mit Immunreaktionen zu rechnen ist. [64] Es ist also nach wie vor unklar, ob sämtliches zelluläres Material entfernt werden muss oder ob eine Art Schwellenwert existiert, unterhalb dessen keine nachteiligen in vivo Konsequenzen zu erwarten sind. Für die Existenz eines solchen Schwellenwertes sprechen einige Untersuchungen der vergangenen Jahre. In diesen konnte unter anderem gezeigt werden, dass viele kommerziell hergestellte dezellularisierte Gewebe messbare Mengen an DNA aufwiesen

ohne dadurch zu klinisch relevanten Immunreaktionen zu führen. [64] Darüber hinaus konnte nach wie vor keine kausale Beziehung zwischen geringen Mengen an Zellresiduen und einer Immunantwort von Seiten des Empfängers nachgewiesen werden. [45] Zudem wird vor allem bezüglich der DZ dichter Gewebe die Meinung vertreten, dass DZ Prozesse kaum in der Lage sein können, 100 % des zellulären Materials zu entfernen. [16] Es wäre also denkbar, dass die effektive Entfernung des Großteils der zellulären Komponenten bereits ausreichen könnte, klinisch relevante Abwehrreaktionen zu vermeiden. Diese Ausführungen dürfen jedoch keineswegs dahingehend verstanden werden, dass eine gründliche Entfernung der Zellen damit obsolet wäre. Vielmehr sollen sie verdeutlichen, dass wahrscheinlich für jedes Gewebe und für jeden individuellen Empfänger ein gewisses Maß an Entfernung der zellulären Bestandteile nötig ist, um Immunreaktionen vorzubeugen. Da jedoch eine solch individualisierte Definition des Ziels im Moment als nicht möglich erscheint, wird nach wie vor die effektive Entfernung möglichst aller zellulärer Bestandteile als Ziel vorgegeben. [50] Um das Erreichen dieser Vorgabe mittels reproduzierbarer Methoden beurteilen zu können, wurden in den vergangenen Jahren drei Punkte definiert, an welchen sich DZ Protokolle orientieren können. Gemäß diesen sollten dezellularisierte Gewebestücke <50 ng dsDNA pro mg EZM (Trockengewicht) sowie DNA Fragmentlängen <200 bp aufweisen. [16, 62, 65] Zusätzlich dürfen in Gewebeschnitt-Färbungen mit 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Hämatoxylin-Eosin (H&E) keine sichtbaren Kerne nachgewiesen werden. [16] Trotz der alleinigen Fokussierung aller drei Vorgaben auf die verbleibende Menge an nukleärem Material beziehungsweise DNA, werden sie dennoch als genereller Maßstab zur Beurteilung des DZ Ergebnisses angesehen. Dies wird dadurch erklärt, dass die DNA nicht nur als einer der Hauptauslöser von Immunreaktionen, sondern darüber hinaus auch als Index für die Gesamtmenge an Zellresiduen gilt. [16, 62] Folglich verspricht man sich von einer möglichst vollständigen Entfernung der DNA ein hohes Maß an immunologischer Sicherheit des hergestellten Gewebestückes. Überprüft werden kann das Erfüllen der beiden ersten Kriterien mithilfe kommerzieller DNA Quantifizierungssets. Das dritte Kriterium lässt sich mithilfe der histologischen Standardfärbung H&E oder der fluoreszenzmikroskopischen DAPI Färbung überprüfen. [64] Für den ebenso wichtigen Erhalt der Matrixkomponenten existieren bisher keine präzise definierten, quantitativen Kriterien. Beurteilt wird der Zustand der EZM daher vor allem anhand qualitativer Methoden. So werden Standardfärbungen wie H&E zur Erlangung eines ersten

Eindrucks über die Gewebestruktur und die Effekte der DZ Prozesse auf jene eingesetzt. Zur weiteren Beurteilung werden spezielle Bindegewebsfärbungen wie Masson Trichrom oder Movat Pentachrom (MPC) sowie fluoreszenzmikroskopische Darstellungen einzelner Matrixbestandteile herangezogen. [16, 66] Darüber hinaus können quantitative mechanische Belastungstests durchgeführt werden. [67, 68]

Das steigende Interesse an den Prozessen der DZ führte in den vergangenen Jahren zur Erforschung ihrer Anwendungsmöglichkeiten an verschiedensten Geweben. Dabei wurden unter anderem Komponenten von Haut- und Bewegungsapparat sowie Gewebe des Gastrointestinal- und Urogenitalsystems untersucht. [17, 50, 69-72] Infolge der intensiven Forschungsbemühungen erreichten immer mehr Produkte dieser Art den medizinischen Markt und deren klinischer Einsatz nahm in beträchtlichem Ausmaß zu. [16] Dabei wurden bisher insbesondere dezellularisierte Haut-, Perikard- und Dünndarmprodukte klinisch eingesetzt. [43] Abgesehen von weniger komplexen Geweben wie Haut und Perikard wurden mittlerweile auch ganze Organe erfolgreich dezellularisiert. Folglich könnte der DZ in Zukunft auch eine entscheidende Rolle in der Organtransplantation zukommen. [47, 73-75] Das Schlagwort Semi-Xenotransplantation beschreibt in diesem Zusammenhang die Idee, dezellularisierte tierische Organe mit humanen Zellen zu besiedeln und anschließend in menschliche Empfänger zu implantieren. [76] Langfristig könnte die DZ dadurch helfen, den Mangel an Spenderorganen zu verringern. [77]

Ungeachtet aller Forschungserfolge zeigten klinische und präklinische Studien bisher noch recht uneinheitliche funktionelle Ergebnisse dezellularisierter Matrixprodukte. So variierten die klinischen Resultate von vielversprechenden Implantat-Funktionen bis hin zum frühzeitigen Versagen der Prothese. [65, 78-80] Selbst bei gleicher Indikationsstellung zur Verwendung dezellularisierter Implantate widersprachen sich die Ergebnisse teils deutlich. Badylak et al. beschrieben beispielsweise den erfolgreichen Einsatz von EZM Produkten zur Reparatur von Defekten des Ösophagus. [81] Doede et al. hingegen berichteten bei gleicher Indikationsstellung von erfolglosen und komplikationsträchtigen Einsätzen dezellularisierter Matrixprodukte. [82] Ähnliche, widersprüchliche Aussagen ließen sich auch zur Eignung dezellularisierter Gewebe in der Reparatur von Defekten der Rotatorenmanschette finden. [83, 84] In Zusammenschau der klinischen Ergebnisse wird somit deutlich, dass das aktuelle Hauptproblem der DZ und ihrer Produkte in deren inkonsistenten Resultaten liegt. Als Ursache hierfür werden ineffiziente DZ Prozeduren gesehen. Diese können sich in

unvollständiger Entfernung des zellulären Materials sowie veränderten biomechanischen Eigenschaften äußern. [64, 85] Als Folge ineffizienter DZ wird somit das Ziel der Herstellung immunogen inerter, biomechanisch intakter Produkte verfehlt. [45, 64, 86]

3.3.2 Dezellularisationsmethoden

Prinzipiell unterscheidet man zwischen chemischen, enzymatischen und physikalischen DZ Methoden. Eingesetzt werden diese anhand verschiedener prozeduraler Behandlungsschemata.

Chemische DZ Methoden beinhalten unter anderem die Verwendung von Säuren und Basen, Alkohol, Detergentien und weiteren Lösungsmitteln. Besonders häufig und erfolgreich wurde in den vergangenen Jahren auf die Gruppe der Detergentien zurückgegriffen. [45] So konnten mithilfe des anionischen Detergens Triton X-100 und der beiden ionischen Detergentien Sodiumdodecylsulfat (SDS) und Sodiumdeoxycholat (SD) eine Vielzahl verschiedener Gewebe erfolgreich dezellularisiert werden. [73, 87-91] Enzymatische DZ Methoden beinhalten den Einsatz von Proteinen wie Trypsin, DNase, RNase oder Kollagenase. [45] Insbesondere die Kombination aus chemischer und enzymatischer DZ erwies sich in den vergangenen Jahren als sehr erfolgreich. [90, 92, 93] Physikalische DZ Methoden umfassen ein weites Gebiet verschiedenster Herangehensweisen. Dabei können die Gewebe in DZ Lösungen geschüttelt oder mit jenen gespült beziehungsweise perfundiert werden. Neben diesen Techniken, die auf die Verwendung von DZ Lösungen angewiesen sind, existieren auch eigenständig einsetzbare physikalische Methoden. Hierzu zählen Kraft, Druck- oder Ultraschallbehandlung ebenso wie Elektroporation und Gefrier-Tau-Vorgänge. [73, 94-99] Gemeinsam ist allen physikalischen Techniken, dass sie für sich alleine als nicht in der Lage gelten, Gewebe komplett zu dezellularisieren. [45] Infolgedessen werden sie meist gemeinsam mit chemischen und enzymatischen DZ Methoden eingesetzt. Dabei gilt die Kombination physikalischer und chemischer Behandlungsansätze als die am häufigsten verwendete DZ Methode. [45] Die prozeduralen Behandlungsschemata beinhalten Gewebe-abhängig verschieden lange DZ Zeiten sowie in der Regel eine abschließende Waschphase. Darüber hinaus inkludieren viele Protokolle intermittierende Waschschriffe mit konsekutivem Ersatz der DZ Lösung. [72, 100]

Seit Beginn der ersten DZ Versuche nahm die Zahl an DZ Methoden und Protokollen stetig zu. In der Folge existieren heutzutage für einzelne Gewebe oft viele verschiedene DZ Protokolle. [95, 101, 102] Da sich diese üblicherweise deutlich unterscheiden, ist eine vergleichende Beurteilung einzelner DZ Methoden oft kaum möglich. Vielmehr kann lediglich die Gesamtheit aller DZ Methoden eines Protokolls beurteilt werden. Zur Lösung dieses Problems begannen in der Vergangenheit einige Arbeitsgruppen DZ Protokolle und deren eingesetzte Methoden konkreter zu vergleichen. Die dabei resultierenden Arbeiten beschäftigten sich Gewebe-spezifisch vor allem mit dem Vergleich verschiedener chemischer und enzymatischer DZ Agentien. So wurden unter anderem Protokolle zur DZ von Hornhaut, Aorta, Herzklappen, Myokard- und Knorpelgewebe auf die Effektivität und biomechanischen Auswirkungen der eingesetzten Agentien untersucht. [85, 88, 103-105] Zwar waren physikalische DZ Methoden meist Bestandteil dieser Protokolle, dennoch wurden diese eher als protokollübergreifende Konstanten in der Auswertung vernachlässigt. [106] Dass dabei Potential zur Effektivitätssteigerung außer Acht gelassen wurde, legt die noch junge Entwicklungsgeschichte perfusionsbasierter DZ Protokolle nahe. Lange Zeit konnten komplexe Organstrukturen nur schwer dezellularisiert werden. Erst mit der Einführung perfusionsbasierter DZ Protokolle gelang es, diese effektiv zu behandeln. [107] Hodgson et al. konnten hierbei durch antegrade Perfusion der Koronarien komplette Herzen innerhalb von 24 h dezellularisieren. [108] Im Gegensatz dazu mussten Singelyn et al. Myokardgewebe für 4-5 Tage unter konstanter Schüttelbewegung in DZ Lösung belassen. Erst nach dieser Zeit konnte sichergestellt werden, dass die Gewebestücke ebenfalls vollständig azellulär waren. [109] Der Unterschied in den Behandlungszeiten verdeutlicht das Potential physikalischer Methoden zur Steigerung der DZ Effektivität. Dieses Potential ist im Kontext perfusionsbasierter Protokolle jedoch lediglich Geweben mit ausreichender Gefäßstruktur vorenthalten. Viele Gewebe werden daher mithilfe deutlich weniger effektiver Arten mit der DZ Lösung inkubiert. Harnblasen, Herzklappen, Blutgefäße und Dünndarmbestandteile können beispielsweise prozedural kontinuierlich in DZ Lösung geschüttelt werden. [16, 94, 95, 106, 110, 111] Hierbei ist zu erwähnen, dass die Protokolldauer nicht nur von der Gewebedicke und -dichte, sondern auch von der Intensität der mechanischen Bewegung abhängt. Da lange DZ Zeiten als Risikofaktor für Schäden an der EZM Struktur gelten, würden dementsprechend vor allem dickere Gewebe von effektiveren Bewegungsformen profitieren. [16]

Neben physikalischen sind auch prozedurale DZ Methoden bisher nur wenig untersucht worden. Viele Protokolle versuchen, durch ausreichend lange Behandlungszeiten und intermittierende Waschschriffe, effektive DZ Prozesse sicherzustellen. Perea-Gil et al. beschrieben beispielsweise ein mehrtägiges Protokoll mit intensiven Waschphasen zur DZ von Myokardgewebe. [104] Die Effekte der prozeduralen Komponenten hierbei konnten aufgrund fehlender Vergleichbarkeit mit anderen Protokollen nicht beurteilt werden.

3.3.3 Dezellularisation in der Herzchirurgie

In den vergangenen Jahren wurde in der herzchirurgischen Forschung viel Aufwand für die Untersuchung der DZ und ihrer Möglichkeiten betrieben. Dabei stand insbesondere die Herstellung von dezellularisierten Herzklappen, Gefäßen und ganzen Herzen im Fokus der Bemühungen. [73, 87, 106, 112, 113] Allen drei Gebieten ist gemeinsam, dass die vergleichbaren konventionellen biologischen und synthetischen Implantate mit Nachteilen behaftet sind. So gelten klassische biologische Herzklappen aufgrund immunogen- und herstellungsbedingter Prozesse nach wie vor als nur begrenzt haltbar. [52, 114, 115] Insbesondere bei Kindern und jüngeren Patienten kommt es oft zu ausgeprägten degenerativen Veränderungen, welche zum frühzeitigen Versagen der Herzklappe führen können. [116, 117] Ausschlaggebend hierfür ist die altersgemäß hohe Aktivität des Immunsystems, welche die degenerativen Prozesse beschleunigt. [118] Synthetische Herzklappen dagegen zeichnen sich zwar durch Langlebigkeit aus, sind jedoch mit der Notwendigkeit dauerhafter Antikoagulation behaftet. [21, 119] Mithilfe der DZ sollen nun die exzellenten hämodynamischen Eigenschaften biologischen Materials mit dauerhafter Haltbarkeit vereint werden. [120-122] Dadurch könnten künftig risikoreiche Re-Operationen, die bisher bei Verwendung biologischer Prothesen häufig nötig waren, vermieden werden. [123] Erste klinische Untersuchungen zum Einsatz dezellularisierter Herzklappen in Pulmonal- und Aortenposition offenbarten bereits sehr vielversprechende Ergebnisse. [78, 124] Dabei zeigten die dezellularisierten Herzklappen niedrigere Raten an Re-Operationen als konventionelle Bioprothesen. [125]

Im Kontext des Ersatzes von Gefäßstrukturen weisen klassische biologische und synthetische Prothesen ebenfalls Limitationen auf. In vielen Bereichen gilt die Verwendung der autologen (patienteneigenen) Vena saphena magna für

Bypassoperationen als der Goldstandard. Deren Einsatz wird jedoch durch aufwändige Präparation und begrenzte Materialmenge erschwert. [126] Synthetische Prothesen dahingegen sind zwar leicht verfügbar, jedoch ist deren Verwendung vor allem im Bereich kleinlumiger Gefäße aufgrund erhöhter Thrombosegefahr limitiert. [127] Dezellularisierte Gefäßprothesen sollen nun die Möglichkeit einer mengenmäßig leichter verfügbaren, biologisch basierten Alternative bieten. [128] Erste Untersuchungen zum in vivo Einsatz derartiger Gefäßprothesen zeigten vielversprechende Ergebnisse. [129, 130]

Im Rahmen von Herztransplantationen stehen aktuell nur klassische biologische Organspenden zur Verfügung. Deren Einsatz wird durch die sinkende Zahl an Spendern zunehmend limitiert. [32] In Kombination mit der zeitgleich steigenden Zahl an transplantationspflichtigen Patienten, herrscht großer Bedarf an neuen Strategien der Implantat-Herstellung. [47, 74] Die Prozesse der DZ bieten hierbei die Möglichkeit eine neue Quelle für Herztransplantate zu erschließen. [73, 131] Dank großer Fortschritte der vergangenen Jahre konnten mittlerweile ganze Herzen von Ratten und Schweinen innerhalb von 12 h beziehungsweise 24 h effektiv dezellularisiert werden. [73, 108] In den kommenden Jahren sollen nun die Prozesse der Zellkultivierung und Re-Zellularisierung ebenso optimiert werden. [132] Gelingt die Kombination erfolgreicher De- und Rezellularisierung, könnten in Zukunft terminal herzinsuffiziente Patienten flächendeckend kausal therapiert werden. [133]

3.4 Ziel der Arbeit

Trotz der Vielzahl an verschiedenen DZ Protokollen können heutzutage noch nicht alle Gewebe effektiv dezellularisiert werden. Während beispielsweise Harnblasen oder Herzklappensegel bereits effektiv behandelt werden können, stellen Gewebe wie die Aorta oder auch die Hornhaut die Forschung noch immer vor Herausforderungen. [71, 100, 134] Oft sind zur DZ solch schwierig zu behandelnder Gewebe lange DZ Protokolle nötig. [103] Hierbei ist zu beachten, dass jedes DZ Agens ab Exposition die mechanischen und ultrastrukturellen Eigenschaften des behandelten Gewebes zunehmend verändern wird. Folglich können die Inkubationszeiten nicht beliebig verlängert werden. [16] Zur Steigerung der Effektivität von DZ Protokollen sollten daher die eingesetzten DZ Methoden systematisch verbessert werden. In diesem Kontext wurden bisher insbesondere physikalische und prozedurale Methoden nur wenig beachtet. Aus diesem Grund lag die Zielsetzung der Arbeit in der systematischen Analyse der Effekte physikalischer und prozeduraler DZ Techniken. Untersucht werden sollten sowohl bereits verwendete als auch neu entwickelte DZ Techniken. Dabei war es entscheidend, dass die jeweiligen Methoden und deren Effekte selektiv beurteilt werden konnten. Dazu sollten eigens hierfür entwickelte Versuchsaufbauten sowie spezifische Vergleichsgruppen für jede zu untersuchende Technik beitragen. Zur Durchführung der Versuche wurde biologisches Gewebe benötigt, welches den DZ Techniken genügend Raum zur Entfaltung ihres vollen Potentials bieten konnte. Dazu sollte ein bisher nur schwierig zu dezellularisierendes Gewebe sowie eine auf das Gewebe abgestimmte DZ Lösung verwendet werden.

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse sollten Möglichkeiten zur Optimierung aktueller und künftiger DZ Protokolle aufgezeigt werden. Dies wurde im Rahmen der Dissertation anhand der Entwicklung eines modifizierten DZ Protokolls beabsichtigt.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Materialvorbereitung

Zur Durchführung der Versuche wurden die Aortenwände (AW) von Schweinen verwendet. Dazu erwarben wir insgesamt 89 frische Schweineherzen, mitsamt deren AW, bei einem lokal ansässigen Schlachthaus. Luftdicht verpackt wurden die Herzen innerhalb von 30 min in das Labor der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik transportiert. Dort stellten wir sicher, dass die AW frei von Defekten und pathologischen Veränderungen wie Aneurysmen waren. Nur Herzen, die gemäß diesen Kriterien intakte AW aufwiesen, wurden weiterverarbeitet. Nachdem die Qualität der AW sichergestellt war, begann deren sorgfältige Präparation. Dabei wurden mithilfe anatomischer Pinzetten, Skalpelle und Scheren alle größeren Fett- und Bindegewebsstücke, welche die Aorta mit den Umgebungsstrukturen verbanden, entfernt. Im Anschluss daran trennten wir die AW unmittelbar oberhalb des sinutubulären Übergangs vom Herzen ab. Die Länge der AW wurde, ausgehend von deren proximalem Ende, einheitlich auf 4 cm festgelegt. Nach Abschluss der bisherigen Schritte begann die Feinpräparation der AW. Dabei wurden die Gefäßstücke intermittierend in Phosphat gepufferter Saline (PBS; PBS Dulbecco w/o Ca^{2+} Instamed 9,55g/L, Biochrom GmbH, Berlin, GER) zwischengelagert, um das Austrocknen der Proben zu verhindern. Dank sorgfältiger Präparation war es möglich, sämtliche makroskopisch sichtbaren Fett- und Bindegewebsadhäsionen, welche nicht zur nativen AW gehörten, zu entfernen. Nach Abschluss der Präparation wurden die AW bei 4 °C in PBS mit 1 Vol.-% einer antibiotisch und antimykotisch wirksamen Lösung (Anti-Anti 100x; Gibco® by Life Technologies GmbH, Darmstadt, GER) inkubiert und innerhalb von 48 h dezellularisiert. AW, die als unbehandelte Nativproben vorgesehen waren, wurden bis zur Auswertung in der oben genannten antimykotisch-antibiotischen Lösung aufbewahrt.

Von den gesamt 89 präparierten AW wurden 5 Stück als native Proben belassen. Die restlichen 84 AW durchliefen die DZ Protokolle der verschiedenen Gruppen.

4.2 Dezellularisation

4.2.1 Dezellularisationslösung

Als Kombinationspartner zu den zu untersuchenden physikalischen Faktoren wurde eine chemische DZ Lösung gewählt. Diese enthielt je 0,5 % der beiden ionischen Detergentien SD (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER) und SDS (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, GER). Dazu lösten wir je Liter PBS 5 g SD und 5 g SDS Pulver. In Glasflaschen wurde die Lösung anschließend bis zum Beginn der DZ Prozeduren bei Raumtemperatur aufbewahrt. Vor Beginn der DZ Prozesse wurde das Gemisch in einem Wasserbad (Julabo SW22, JULABO GmbH, Seelbach, GER) langsam auf 37 °C erhitzt. Anschließend gaben wir die Lösung in die dafür vorgesehenen Behältnisse der Versuchsaufbauten, in welchen sich die AW während des Prozesses in Immersion befanden. Um Temperatur- oder pH-Wert-bedingte Denaturierungsprozesse der Proteine zu vermeiden, wurden konstante Temperaturverhältnisse gewährleistet und die pH-Wert Veränderungen stündlich mithilfe eines pH-Meters (inoLab pH Level 1, WTW, Weilheim, GER) kontrolliert. [135-138]

Nach Abschluss der Inkubationszeiten mit der chemischen DZ Lösung wurden alle AW einer finalen Waschphase mit NaCl (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, GER) unterzogen (s. 4.2.5 Inkubationsprotokolle).

4.2.2 Orbitaler Schüttel-Inkubator

Kontinuierliches Schütteln der Versuchsproben in Lösung wurde als Kontrollgruppe (G_c) gewählt. Dafür wurden die AW in einem zylinderförmigen, verschlossenen Plastikbehältnis (**s. Abb. 4-1 B**) mit 0,5l DZ Lösung in Immersion gebracht. Anschließend stellten wir das Inkubationsbehältnis in ein abgeschlossenes orbitales Schüttel-Inkubator-System (Inkubationshaube TH 15, Edmund Bühler GmbH, Echingen, GER) mit einstellbarer Schüttelfrequenz und Temperaturregler (**s. Abb. 4-1 C**). Dort wurde das Inkubationsbehältnis zentral auf der Schüttelebene platziert und bei 37 °C kontinuierlich mit einer Frequenz von 90 bpm geschüttelt. Um freie Beweglichkeit der AW zu garantieren, war die Stückzahl pro Durchgang auf $n = 3$ begrenzt worden. So stellten wir sicher, dass die AW während des gesamten Prozesses kontinuierlich in der DZ Lösung geschüttelt wurden. Beobachtet und bestätigt werden konnte dies dank durchsichtiger Behältnisse und eines Sichtglases im Inkubator-System. Vor Beginn der

finalen Waschphase mit NaCl wurde der Schüttel-Inkubator kurzzeitig geöffnet und die Heizfunktion deaktiviert, sodass diese abschließende Phase (s. 4.2.6 Inkubationsprotokolle) bei Raumtemperatur stattfinden konnte (**s. Abb. 4-1**).

Insgesamt 24 AW wurden als Kontrollproben aus G_c mithilfe dieses Systems für 4 h oder 8 h dezellularisiert.

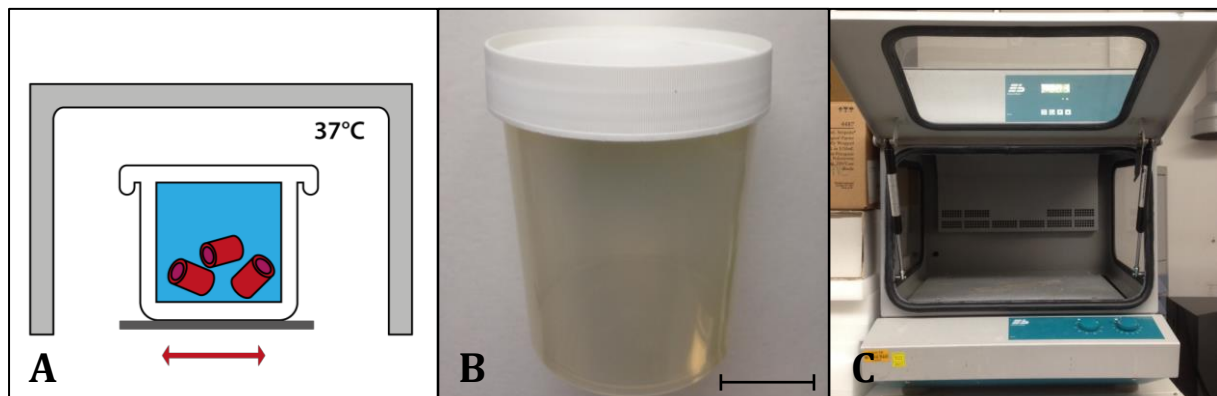


Abbildung 4-1: Versuchsaufbau G_c : Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (A): Die AW (rot dargestellt) befanden sich in einem Plastikbehälter (B) in Inkubation mit der DZ- oder Waschlösung. Währenddessen wurden die AW bei 37 °C mit einer Frequenz von 90 bpm in einem orbitalen Schüttel-Inkubator (C) geschüttelt. Maßstabsbalken: 5cm.

4.2.3 Flusdezellularisation

Zirkuläre Bewegung der Versuchsproben durch kontinuierlichen Fluss der Lösung diente als DZ Methode für 24 AW aus Gruppe 1 (G_1). Für dieses Konzept der Flusdezellularisation bediente man sich einer Pumpe, welche kontinuierlichen Zu- und Abfluss an DZ- beziehungsweise Waschlösung ermöglichte. Durch den ständigen Lösungsfluss wurden die AW kontinuierlich in einem zirkulären Flüssigkeitsstrom bewegt. Zur Erzeugung der Flussbewegung brachten wir die AW zunächst in einem Inkubationsbehälter in Immersion (**s. Abb. 4-2 B**). Dieses wurde mithilfe eines Schlauches ($d_i = 13 \text{ mm}$) mit einem Reservoir verbunden, welches ebenfalls mit Lösung gefüllt war und in welchem sich eine herkömmliche Aquariumpumpe (Eden 114 Aquariumpumpe, 11 W, PfG GmbH, Hörstel, GER) befand (**s. Abb. 4-2 D**). Diese förderte mit einer Leistung von 11 W pro Minute 10 l Flüssigkeit durch einen Pumpenschlauch ($d_i = 8 \text{ mm}$) in das Inkubationsbehälter. Somit wurde nach Einschalten der Pumpe kontinuierlich Flüssigkeit in das Inkubationsbehälter gepumpt und im Gegenzug hydrostatisch über den dickeren Verbindungsschlauch wieder rückgeführt. Durch dieses

Kreislaufsystem konnten in beiden Behältnissen konstante Flüssigkeitsspiegel aufrechterhalten werden. Nach Füllen des Systems mit 1,7 l Flüssigkeit befanden sich somit im Inkubationsbehältnis – vergleichbar zu G_c – dauerhaft ca. 0,5 l Lösung. Die restlichen 1,2 l befanden sich im Pumpenreservoir und den beiden Schläuchen. Zur Ermöglichung des zirkulären Flusses, platzierten wir die beiden Schläuche an definierten Punkten des Inkubationsbehältnisses: Der Pumpenschlauch wurde seitlich in das Inkubationsbehältnis eingeführt und dort zirkulär an den Rand gelegt. Nach Aktivieren der Pumpe wurde dadurch die zirkuläre Flüssigkeitsbewegung erreicht. Der dickere Verbindungsschlauch gelangte durch eine zentrale Öffnung in das Inkubationsbehältnis (**s. Abb. 4-2 E**). Der um diesen Schlauch ausgelöste Sog stabilisierte die Kreisbewegungen der AW. Um zu verhindern, dass sich die Versuchsproben am Verbindungsschlauch festsaugten, bohrten wir kleine, zirkulär angeordnete Löcher in das Ende des Schlauches (**s. Abb. 4-2 C**). Diese halfen, dort den Sog zu reduzieren und ein Ansaugen der AW effektiv zu vermeiden. Pro Durchgang wurden jeweils 3 AW behandelt. Die Beobachtung und Bestätigung der Flussbewegung konnte dank des durchsichtigen Inkubationsbehältnisses visuell erfolgen. Um während der Hauptphase der DZ Prozedur wie in G_c eine Versuchstemperatur von 37 °C zu erreichen, platzierten wir das Inkubationsbehältnis in einem Thermostat-kontrollierten Wasserbad (Julabo SW22). Mit Abschluss der SD-SDS Behandlung wurde die Heizfunktion deaktiviert, sodass die finale Waschphase bei Raumtemperatur ablaufen konnte (**s. Abb. 4-2**).

Alle 24 AW aus G_1 wurden mithilfe dieses Aufbaus für 4 h oder 8 h behandelt.

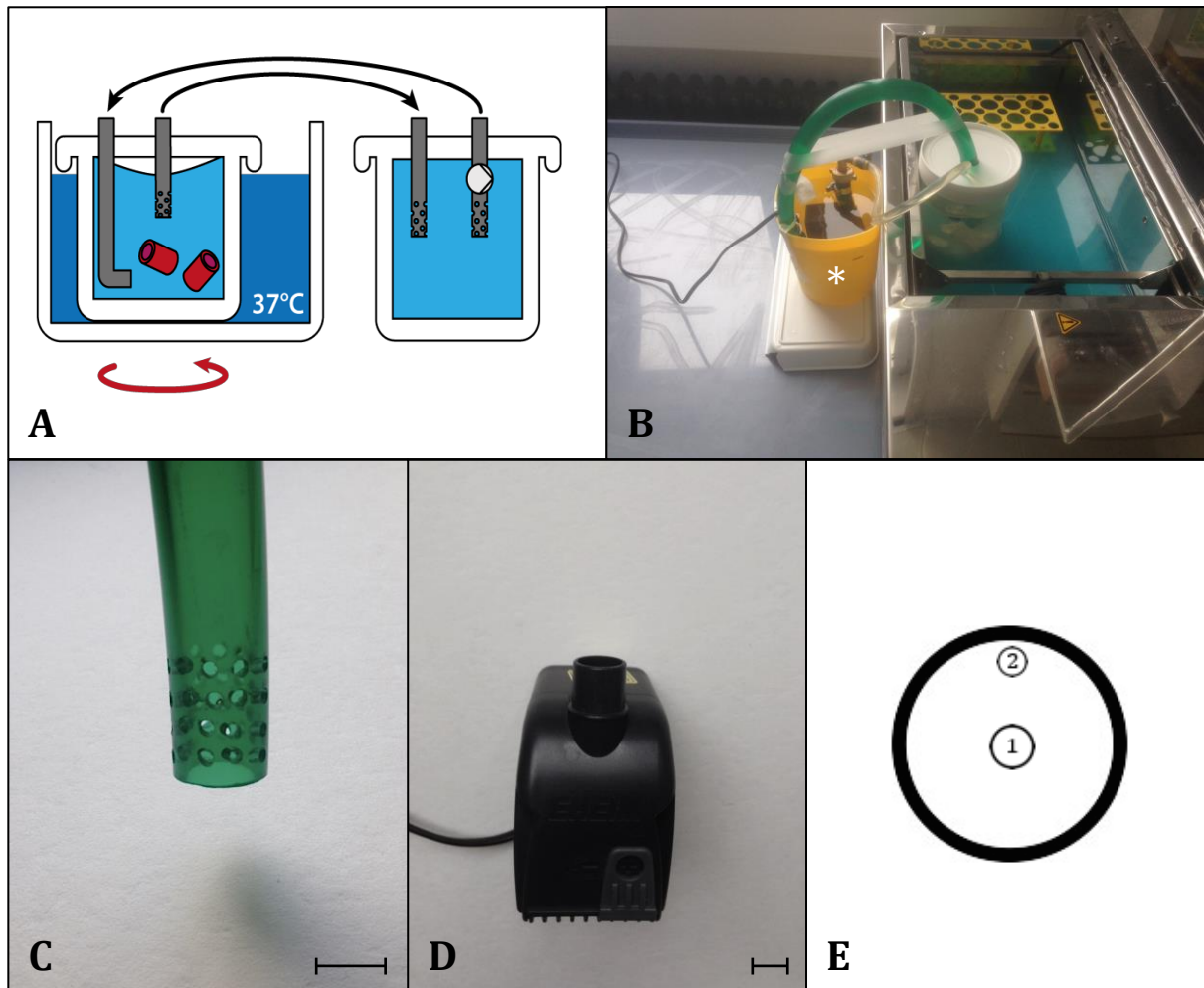


Abbildung 4-2: Versuchsaufbau G_1 (A, Schematische Darstellung; B, Praktische Umsetzung): Die AW (A, rot dargestellt) befanden sich in einem Plastikbehältnis, welches über einen Schlauch (C) mit einem Reservoir (B, weißer Stern) verbunden war. In diesem befand sich eine Pumpe (D), welche über einen Schlauch kontinuierlich DZ- oder Waschlösung in das Inkubationsbehältnis pumpte. Rückgeführt wurde die Lösung hydrostatisch über den Verbindungsschlauch (C). Durch randständiges Einföhren des Pumpen- (E, 2) und zentrales Einföhren des Verbindungsschlauches (E, 1) wurde im Inkubationsbehältnis eine zirkuläre Flussbewegung erzeugt. Zur Aufrechterhaltung konstanter Temperaturverhältnisse befand sich das Inkubationsbehältnis in einem Thermostat-kontrollierten Wasserbad. Maßstabsbalken: 1cm.

4.2.4 Flusdezellularisation und Ultraschallbehandlung

Um die Effekte additiver Ultraschallbehandlung zu analysieren, wurden 24 AW als Gruppe 2 (G_2) mithilfe eines modifizierten Versuchsaufbaus aus G_1 behandelt. Dazu platzierten wir das Inkubationsbehältnis der AW in einem mit destilliertem Wasser gefüllten Ultraschallbad (Ultrasonic Cleaner USC600T, 120 W, 45 kHz, VWR International GmbH, Darmstadt, GER). Das Wasser diente der Übertragung der Ultraschallwellen auf das Inkubationsbehältnis und die darin befindlichen AW. Da die

kontinuierliche Energieabgabe des Ultraschallbades zu einer Erwärmung des destillierten Wassers und damit des Inkubationsbehältnisses führte, musste das System kontinuierlich gekühlt werden. Dazu stellten wir das Pumpenreservoir in ein mit Eiswasser gefülltes Becken. Der dortige Eisbestand wurde alle 15 min nach Messung der aktuellen Temperatur im Pumpenreservoir je nach Bedarf aufgestockt oder reduziert. Mithilfe dieser Kühlmethode sollte während der DZ Prozedur eine konstante Temperatur von 37 °C aufrechterhalten werden (**s. Anhang Temperaturmesswerte G₂**). Die abschließende Waschphase mit NaCl sollte wiederum bei Raumtemperatur stattfinden. Da hierbei die Waschlösung kontinuierlich ausgetauscht wurde (s. 4.2.6 Inkubationsprotokolle), führte die Energie des US-Bads nur mehr zu vernachlässigbar geringen Änderungen der Temperatur. Somit konnte während dieser letzten Phase auf die Kühlung des Systems verzichtet werden (**s. Abb. 4-3**).

Alle 24 AW aus G₂ wurden mithilfe dieses Versuchsaufbaus behandelt und waren hierbei während der gesamten Prozedur Flussbewegung und Ultraschallbehandlung ausgesetzt.

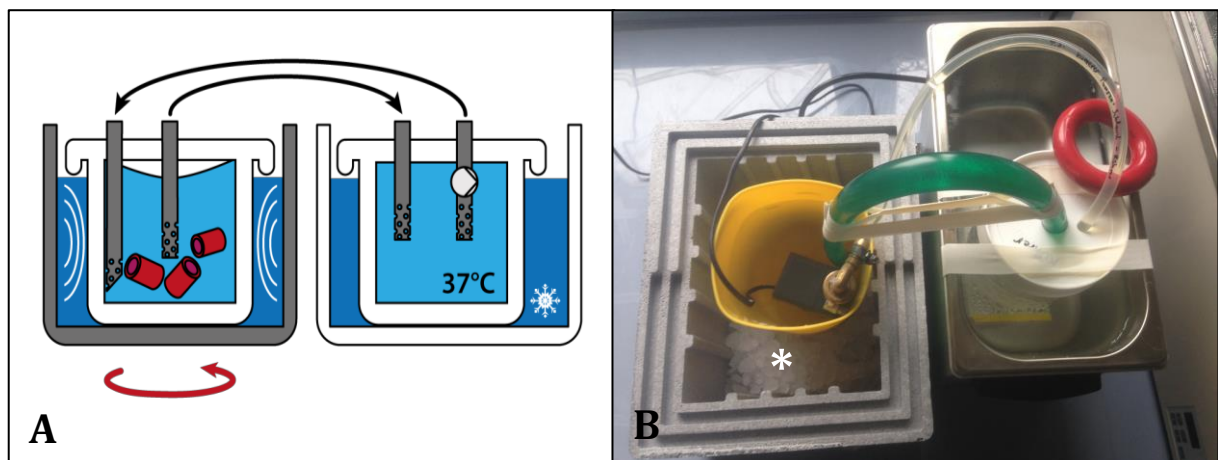


Abbildung 4-3: Versuchsaufbau G₂: (A, Schematische Darstellung; B, Praktische Umsetzung): Die AW (A, rot dargestellt) befanden sich einem Plastikbehältnis. Dieses war gemäß des Prinzips aus G₁ (s. Abb. 4-2) mit dem Pumpenreservoir verbunden, sodass die AW einer zirkulären Flussbewegung ausgesetzt waren. Das Inkubationsbehältnis befand sich in einem mit destilliertem Wasser gefüllten Ultraschallbad und wurde durch einen Beschwerungsring (B, roter Ring) stabilisiert. Die Ultraschallwellen wurden durch das Wasser auf das Inkubationsbehältnis übertragen. Aufgrund der stetigen Erwärmung durch die Ultraschallwellen befand sich das Pumpenreservoir in einem mit Eiswasser gefüllten Becken (B, weißer Stern). Der dortige Eisbestand wurde während der DZ zur Aufrechterhaltung von konstanten 37 °C je nach aktuell gemessener Temperatur angepasst.

4.2.5 Inkubationsprotokolle

Die 72 AW aus G_c , G_1 und G_2 wurden für 4 h oder 8 h mit SD-SDS behandelt. Die Inkubation mit der DZ Lösung fand entweder kontinuierlich oder in repetitiven Behandlungszyklen statt. Ein Zyklus bestand dabei aus je 2 h Inkubationszeit mit SD-SDS und 30 min Waschen mit NaCl. Dabei entfiel nach dem jeweils letzten SD-SDS Zyklus der 30-minütige Waschschrift. Somit wurden die AW während 4 h zyklischer DZ einmal und während 8 h zyklischer DZ dreimal intermittierend mit NaCl gewaschen. Zu Beginn eines jeden neuen Inkubationszyklus wurden die Systeme komplett geleert und mit frischem SD-SDS beziehungsweise mit NaCl gefüllt. Sowohl die Inkubation mit SD-SDS, als auch die intermittierenden Waschschriffe fanden bei 37 °C statt. Nach Abschluss der chemischen Behandlung wurden alle AW gründlich mit NaCl gespült. Dazu wurden die AW in den jeweiligen Versuchsaufbauten belassen und bei Raumtemperatur für 10 x 15 min mit NaCl gewaschen. Dabei säuberten wir zu Beginn der Waschphase die Systeme aller drei Gruppen und füllten diese mit NaCl auf. Anschließend tauschten wir in G_c alle 15 min die komplette NaCl Menge aus, sodass bei jeweils 0,5 l insgesamt 5 l NaCl für den Waschvorgang verwendet wurden. Da im Gegensatz zu G_c ständige Unterbrechungen der Prozeduren bei G_1 und G_2 nicht mit dem Zeitplan der DZ Protokolle zu vereinbaren gewesen wären, wurde für diese Gruppen ein anderes Verfahren angewandt. Dieses sah kontinuierliches Abschöpfen von NaCl aus dem Pumpenreservoir vor, welches im Gegenzug mit frischer NaCl Lösung wiederaufgefüllt wurde. Um vergleichbare Verhältnisse zu G_c zu schaffen, wurde darauf geachtet, auch in G_1 und G_2 zehn Mal die komplette Menge an NaCl zu ersetzen, was einer Gesamtmenge von 17 l entsprach. Insgesamt wurden je Inkubationszeit (4 h bzw. 8 h) und -schema (kontinuierlich oder zyklisch) 6 AW pro Gruppe behandelt. Auch während der Waschprozeduren waren die AW den jeweils zu untersuchenden physikalischen Faktoren ihrer Gruppe ausgesetzt. So wurden die AW je nach Gruppenzugehörigkeit während der gesamten Prozedur kontinuierlich geschüttelt (G_c) oder im Flüssigkeitsstrom bewegt (G_1 , G_2) und mit Ultraschall behandelt (G_2). Die angegebenen Inkubationszeiten (4 h bzw. 8 h) bezogen sich jeweils auf die Dauer der SD-SDS Behandlung. Die intermittierenden und finalen Waschschriffe wurden hier nicht berücksichtigt. Somit war die Gesamtdauer der Prozeduren, inklusive der Waschphasen, länger als 4 h bzw. 8 h (**s. Tab. 4-1**).

Tabelle 4-1: Inkubationsprotokolle G_c, G₁ und G₂.

Gruppe		G _c	G ₁	G ₂
Methode		Schüttel-Inkubator	Fluss	Fluss + Ultraschall
Anzahl (n)		n = 24 (6 je Inkubation)	n = 24 (6 je Inkubation)	n = 24 (6 je Inkubation)
Inkubation	4h	4h SD-SDS		
	4h zyklisch	1x (2h SD-SDS – 30min NaCl) – 2h SD-SDS		
	8h	8h SD-SDS		
	8h zyklisch	3x (2h SD-SDS – 30min NaCl) – 2h SD-SDS		
Waschen		10 x 15min NaCl		

4.2.6 Weiterentwicklung

Basierend auf den Ergebnissen des Gruppenvergleichs und der verschiedenen Inkubationsdauern (4 h vs. 8 h) und –schemata (kontinuierlich vs. zyklisch), entwickelten wir ein weiteres DZ Protokoll (Gruppe 3, G₃). Als Vergleichskollektiv hierzu diente eine zweite Kontrollgruppe (Kontrollgruppe 24 h, G_{c-24h}).

Der Versuchsaufbau aus G₃ basierte auf Modifikationen des Aufbaus aus G₂ (**s. Abb. 4-3 und 4-4 A**). Dabei verwendeten wir eine leistungsfähigere Pumpe (Eden 155, 80 W, PfG GmbH), welche für die Durchführung der Versuche auf eine Förderleistung von 20 l/min eingestellt worden war (**s. Abb. 4-4 B**). Gefördert wurden die höheren Flussvolumina durch einen Pumpenschlauch mit größerem Lumen ($d_i = 11$ mm). Neben dem Austausch der Pumpe sah das Behandlungsprotokoll darüber hinaus einen modifizierten Einsatz der Ultraschallbehandlung vor. Hierbei wurden die AW im Gegensatz zu G₂ nicht kontinuierlich, sondern intermittierend beschallt. Als Folge des begrenzten Ultraschalleinsatzes entfielen der Effekt der stetigen Lösungserwärmung und damit die Notwendigkeit der Eiswasserkühlung aus G₂. Zur Aufrechterhaltung von konstanten DZ Temperaturen platzierten wir das Pumpenreservoir im Thermostat-kontrollierten Wasserbad. Nach Ende der SD-SDS Behandlung deaktivierten wir die Heizfunktion des Bades, sodass die finale Waschphase bei Raumtemperatur ablaufen konnte. Neben Modifikationen des Versuchsaufbaus wurden auch Inkubationsdauer und Behandlungszyklen weiterentwickelt. Insgesamt behandelten wir 6 AW als G₃ für 24 h mit SD-SDS. Zusammengesetzt war die Zeitspanne aus einer 15-stündigen SD-SDS Inkubation zu Beginn und drei sich anschließenden Zyklen mit jeweils 1 h NaCl Waschen

und 3 h SD-SDS Behandlung. Beschallt wurden die AW dabei nur für je 30 min zu Beginn eines jeden neuen Abschnitts des Protokolls. So ergab sich insgesamt eine Zeit von 240 Minuten, in der die AW den zusätzlichen Effekten des Ultraschalls exponiert waren. Nach Abschluss der SD-SDS Inkubation wurden die AW für 10 x 15 min mit NaCl gespült. Dabei wurde die Waschlösung gemäß des für G_1 und G_2 beschriebenen Prinzips kontinuierlich gewechselt (**s. Tab. 4-2.**).

Das Protokoll der für G_3 gebildeten Vergleichsgruppe G_{c-24h} beinhaltete eine 24-stündige kontinuierliche SD-SDS Behandlung im Schüttel-Inkubator (**s. Abb. 4-1**). Die Behandlung der 6 hierfür vorgesehenen AW erfolgte mit den Schüttelfrequenz (90 bpm) und Temperatureinstellungen (37 °C) aus G_c . Nach Abschluss der SD-SDS Inkubation wurden die AW dieser Gruppe ebenfalls für 10 x 15 min mit NaCl gespült. Dabei wurde die Spüllösung gemäß des Prinzips aus G_c alle 15 min gewechselt (**s. Tab. 4-2**).

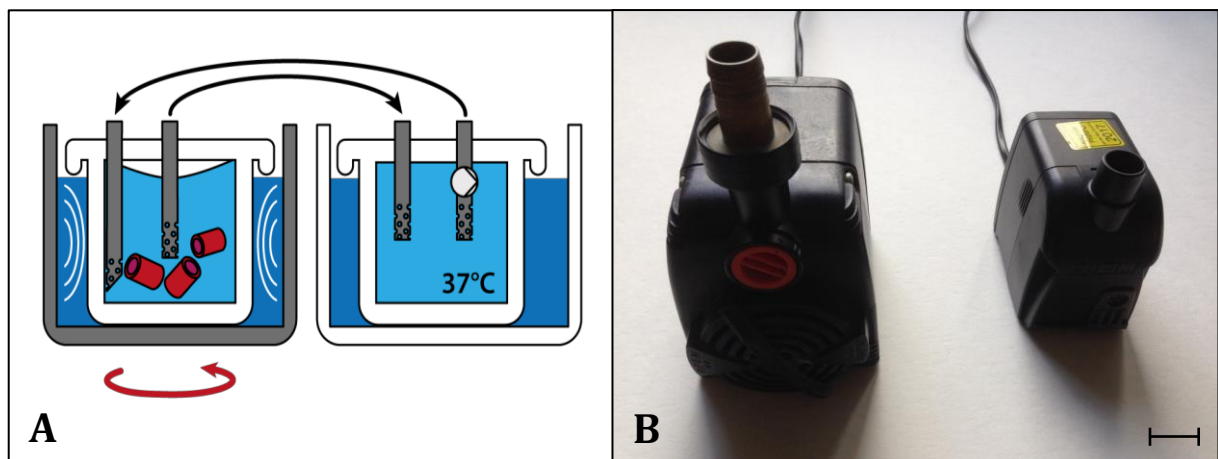


Abbildung 4-4: Schematischer Versuchsaufbau G_3 (A): Der Versuchsaufbau aus G_3 entsprach einer modifizierten Form des Aufbaus aus G_2 . Dabei war die für G_1 und G_2 verwendete Pumpe (B, rechts im Bild) durch ein leistungsfähigeres Modell (B, links im Bild) ersetzt worden. Mit der Pumpe wurde auch ein neuer Pumpenschlauch verwendet. Die Verbindung zwischen dem Inkubationsbehältnis und dem Pumpenreservoir erfolgte wie für G_1 und G_2 beschrieben (s. Abb. 4-2). Das Inkubationsbehältnis befand sich wie bei G_2 im Ultraschallbad. Das Pumpenreservoir befand sich im Gegensatz zum Versuchsaufbau aus G_2 nicht in einem Eisbecken, sondern in einem Temperatur-geregelten Wasserbad. Maßstabsbalken: 2cm.

Tabelle 4-2: Inkubationsprotokolle G₃ und G_{c-24h}.

Gruppe	G₃	G_{c-24h}
Methode	Modifizierte Kombination Fluss + Ultraschall	Schüttel-Inkubator
Anzahl (n)	n = 6	n = 6
Inkubation	15 h SD-SDS – 3x (1h NaCl – 3h SD-SDS) US je 30 min zu Beginn jedes Abschnitts	24 h SD-SDS
Waschen	10 x 15 min NaCl	

4.3 Weiterverarbeitung der Proben

Nach Abschluss der DZ Prozeduren begannen die Vorbereitungen zur Herstellung von Rasterelektronenmikroskopie (REM) Proben und Gewebeschnitten. Dazu wurden die Gewebestücke mit verschiedenen Fixierungslösungen inkubiert. Für die Vorbereitung zur REM war es nötig, die Aortenstücke für mindestens 48 h bei 4 °C in Fix-II-Lösung (912 ml Ampuwa; Fresenius Kabi AG + 86,5 ml Glutaraldehydlösung 25 Gew.-%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH + 1,5 ml HCL; Merck KGaA, Darmstadt, GER + 11,3 g Na-CaCO₃; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zu lagern. Zur Herstellung der Gewebeschnitte mussten die AW in Formalinlösung 4,5 % (Roti®-Histofix 4,5%, Carl Roth GmbH + Co.KG) für mindestens drei Tage bei Raumtemperatur fixiert werden. Nach Ablauf der genannten Mindestzeiten konnten die Gewebestücke weiter verarbeitet und ausgewertet werden.

5 AUSWERTUNG

5.1 Histologische Probenaufarbeitung

5.1.1 Probengewinnung

Von den in Formalinlösung fixierten Teilen der AW wurden Stücke à 5 mm Höhe und 10 mm Länge ausgeschnitten. Die Stücke, die einen kompletten Querschnitt durch die AW darstellten, wurden anschließend in gefensterten Einbettkassetten aus Plastik (Lab Logistics Group GmbH, Meckenhelm, GER) eingeschlossen. Daraufhin färbten wir die AW für 4 min in Hämalaun (Mayer's Hämalaunlösung 1:3 mit PBS verdünnt, Merck KGaA) und spülten sie für 3 x 2 min in aqua destillata (AD; Ampuwa, Fresenius Kabi AG). Sinn der Anfärbung mit Hämalaun war es, die Außengrenzen der Gewebestücke farbig zu markieren, um diese hinterher beim Anfertigen der Schnitte im Paraffinblock zu erkennen. Die angefärbten AW durchliefen als nächstes eine maschinelle Alkoholreihe. Diese bestand aus je einstündigen Inkubationen mit zwei Mal Ethanol 70 Vol.-%, drei Mal Ethanol 96 Vol.-% und drei Mal Ethanol 100 Vol.-%. Im Anschluss daran fanden zwei ebenfalls einstündige Behandlungen mit Xylol 100 % statt, bevor die Proben zwei Mal für 120 min in Paraffin inkubiert wurden. Nach Abschluss des maschinellen Prozesses bewahrten wir die Gewebestücke in ihren Kassetten in einem Paraffinbad auf. In diesem wurden die AW aus den Einbettkassetten entnommen und in senkrechter Position in Formen für Paraffinblöcke platziert. Nach Auffüllen der Formen mit Paraffin, wurden die so angefertigten Paraffinblöcke zur Aushärtung auf Kälteplatten gelagert. Anschließend konnte die Herstellung der Gewebeschnitte erfolgen (**s. Abb. 5-1 A**).

5.1.2 Paraffinschnitte

Mithilfe eines Schlittenmikrotoms (Schlittenmikrotom HM 400 R, Microm International GmbH, Walldorf, GER) stellten wir aus den angerfertigten Blöcken Paraffinschnitte her. Dazu wurden die Paraffinblöcke so weit angeschnitten, bis die AW in vollständigem transversalem Umfang in den Schnitten repräsentiert waren. Hierzu erwies sich die vorherige Anfärbung der Außengrenzen der AW mit Hämalaun als hilfreich. Die gewählte Dicke der Paraffinschnitte betrug 6 µm. Die frischen Schnitte überführten wir vom Mikrotom in ein auf 48 °C temperiertes Streckbad (Paraffinstreckbad Typ 25900, MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster, GER). Anschließend wurden die Schnitte auf

Objektträger (Thermo SCIENTIFIC Superfrost Ultra Plus®, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, GER) gezogen und über Nacht in einem Wärmeschrank (Wärmeschrank WTC, Binder, Tuttlingen, GER) bei 40 °C getrocknet (**s. Abb. 5-1 B**). Danach konnten die Schnitte bis zu ihrer Färbung bei Raumtemperatur in lichtgeschützten Boxen gelagert werden.

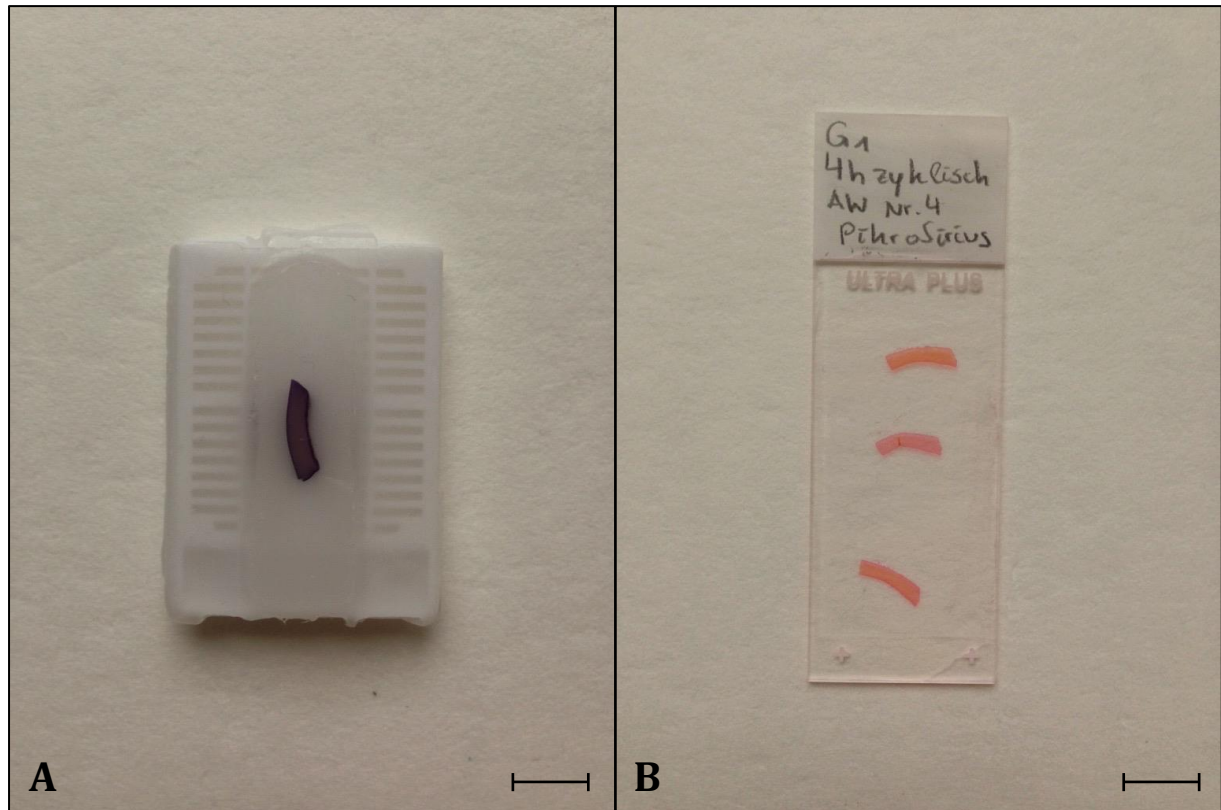


Abbildung 5-1: Paraffinblock und Objektträger: Die senkrecht ausgerichtete AW war blau-braun im Paraffinblock zu erkennen (A). Je drei Paraffinschnitte fanden Platz auf einem Objektträger. Dieser war mit Gruppenzugehörigkeit, Inkubationszeit und -schema, Protokoll-interner AW Nummer sowie Färbemethode beschriftet (B). Maßstabsbalken: 1cm.

5.1.3 Entparaffinierung

Vor Durchführung der Färbungen mussten die Gewebeschnitte entparaffiniert werden. Dafür wurden die Objektträger für 30 min bei 50 °C im Wärmeschrank inkubiert und anschließend einem chemischen Entparaffinierungsprozess zugeführt. Dieser bestand aus einer Behandlung mit Lösungsmitteln gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe und abschließendem Spülen. Für die H&E und DAPI Färbung wurde dafür ein identisches Entparaffinierungsprotokoll verwendet. Bei den MPC und Pikro-Siriusrot (PSR) Färbungen wurden jeweils leicht abgewandelte, individuell vom Hersteller empfohlene, Prozeduren angewandt (**s. Tab. 5-1**). Das Protokoll für H&E und DAPI

Färbung enthielt zu Beginn für 2 x 15 min Inkubationen mit Roti-Histol (Roti-Histol, Carl Roth GmbH + Co.KG). Daraufhin fanden für je 2 x 5 min Behandlungen mit Ethanol 100, 96 und 70 Vol.-% (Ethanol 100/96/70 Vol.-% vergällt, Apotheke Klinikum Großhadern) statt. Abschließend wurden die Schnitte für je 2 x 3 min mit AD und PBS gespült. Die herstellereigenen Protokolle (MORPHISTO® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, GER) der MPC und PSR Färbungen unterschieden sich in einigen Punkten: So fanden initial anstatt Roti-Histol zwei Xylol-Inkubation für je 5 min Dauer bei MPC und für je 10 min Dauer bei PSR statt. Im Anschluss daran schlossen sich bei MPC für je 2 min und bei PSR für je 4 min Inkubationen mit vergälltem Ethanol 96, 80, 70 und 60 Vol.-% an. Abschließend wurde einmalig mit AD für 2 min bei MPC und für 4 min bei PSR gespült. Nach Durchführung der Entparaffinierungsprotokolle begannen wir unmittelbar mit der Färbung der Paraffinschnitte.

Tabelle 5-1: Entparaffinierungsprotokolle für histologische und Fluoreszenzfärbungen.

H&E / DAPI			MPC	PSR
Schritt	Dauer	Schritt	Dauer	Dauer
Roti-Histol	2 x 15 min	Xylol	2 x 5 min	2 x 10 min
Ethanol 100 Vol.-%	2 x 5 min	Ethanol 96 Vol.-%	1 x 2 min	1 x 4 min
Ethanol 96 Vol.-%	2 x 5 min	Ethanol 80 Vol.-%	1 x 2 min	1 x 4 min
Ethanol 70 Vol.-%	2 x 5 min	Ethanol 70 Vol.-%	1 x 2 min	1 x 4 min
AD	2 x 3 min	Ethanol 60 Vol.-%	1 x 2 min	1 x 4 min
PBS	2 x 3 min	AD	1 x 2 min	1 x 4 min

5.2 DAPI Fluoreszenz

5.2.1 Allgemeines

Fluoreszenz beschreibt das Phänomen spontaner Licht-Emission eines zuvor angeregten Materials. Dieses Prinzip macht man sich in der mikroskopischen Darstellung bestimmter Zellkomponenten zugute. Dabei verwendet man Fluoreszenzfarbstoffe, welche alleine oder mit Hilfe bestimmter Antikörper an die gewünschten Zellstrukturen binden. Durch Anregung mit Licht definierter Wellenlänge können die Farbstoffe selektiv aktiviert werden. Daraufhin emittieren diese wiederum Licht bestimmter Wellenlänge, welches detektiert werden kann. Dabei gibt die Intensität des Signals Auskunft über die Menge der farbstoffbindenden Zellstrukturen. [139] Eine der am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfärbungen ist die DAPI Kernfärbung. Der hierzu verwendete DAPI Farbstoff lagert sich an Adenin-Thymin reiche Regionen in der kleinen Furche von doppelsträngiger DNA (dsDNA) an. Bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht von ca. 340 nm Wellenlänge, fluoresziert der Farbstoff in blauer Farbe. Das Emissionsmaximum liegt hierbei bei ca. 460 nm. Gemäß des Prinzips der Fluoreszenzdetektion ist die Intensität des emittierten Lichts proportional zur Menge an dsDNA. [140-142] Durch Auswertung der Lichtintensität in den dezellularisierten AW ließen sich somit Rückschlüsse auf die verbleibende Menge an Kernen ziehen.

5.2.2 Färbeprotokoll

Nach der Entparaffinierung inkubierten wir die Gewebeschnitte für 2 min mit einer 1:1 Mischung aus Methanol (Methanol for analysis, Merck KGaA) und Aceton (Acetone for analysis, Merck KGaA), um die Zellmembranen zu permeabilisieren. Anschließend wurden die Schnitte für 2 x 3 min in PBS gewaschen, bevor sie für 5 min mit DAPI Lösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, $c = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in PBS) inkubiert wurden. Daraufhin spülten wir die Schnitte für 5 min in PBS und färbten für 2 min mit Sudanschwarz 0,3 Vol.-% in Ethanol 70 Vol.-% (Sudanschwarz B für die Mikroskopie, Carl Roth GmbH + Co.KG) gegen, um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Abschließend spülten wir die Schnitte für 2 x 3 min mit AD (**s. Tab. 5-2**).

Tabelle 5-2: Färbeprotokoll der DAPI Färbung

DAPI Färbeprotokoll	
Entparaffinieren	
Schritt	Dauer
MetOH-Aceton (1:1)	1 x 2 min
PBS	2 x 3 min
DAPI, c = 0,1 µg/ml	1 x 5 min
PBS	1 x 5 min
Sudanschwarz , c = 0,3 Vol.-%	1 x 2 min
AD	2 x 3 min
Mikroskopieren	

5.2.3 Mikroskopie

Die Auswertung der DAPI Ergebnisse erfolgte mithilfe 50 x und 100 x vergrößerter fluoreszenzmikroskopischer (AxioObserver Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER) Aufnahmen. Diese wurden für alle Proben unter konstanter Belichtungszeit (400 ms) mit einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 461 nm angefertigt. Die Effektivität der DZ quantifizierten wir anhand der nichtfluoreszierenden Schichtdicken der AW. Die Ausdehnung dieser Schichten wurde senkrecht von den Probenoberflächen ausgehend gemessen und als Eindringtiefe (EDT) bezeichnet. Mithilfe einer Analysesoftware (AxioVision Rel. 4.8, Carl Zeiss AG) bestimmten wir für jedes behandelte Gewebestück drei repräsentative, maximale EDT (**s. Abb 5-2**). Aus den je drei Werten wurde anschließend ein Mittelwert für die innere (EDT_i) und die äußere (EDT_a) Oberfläche eines jeden Aortenstücks bestimmt. Die DAPI Färbung erlaubte somit die Quantifizierung der DZ Effektivität der untersuchten Faktoren.

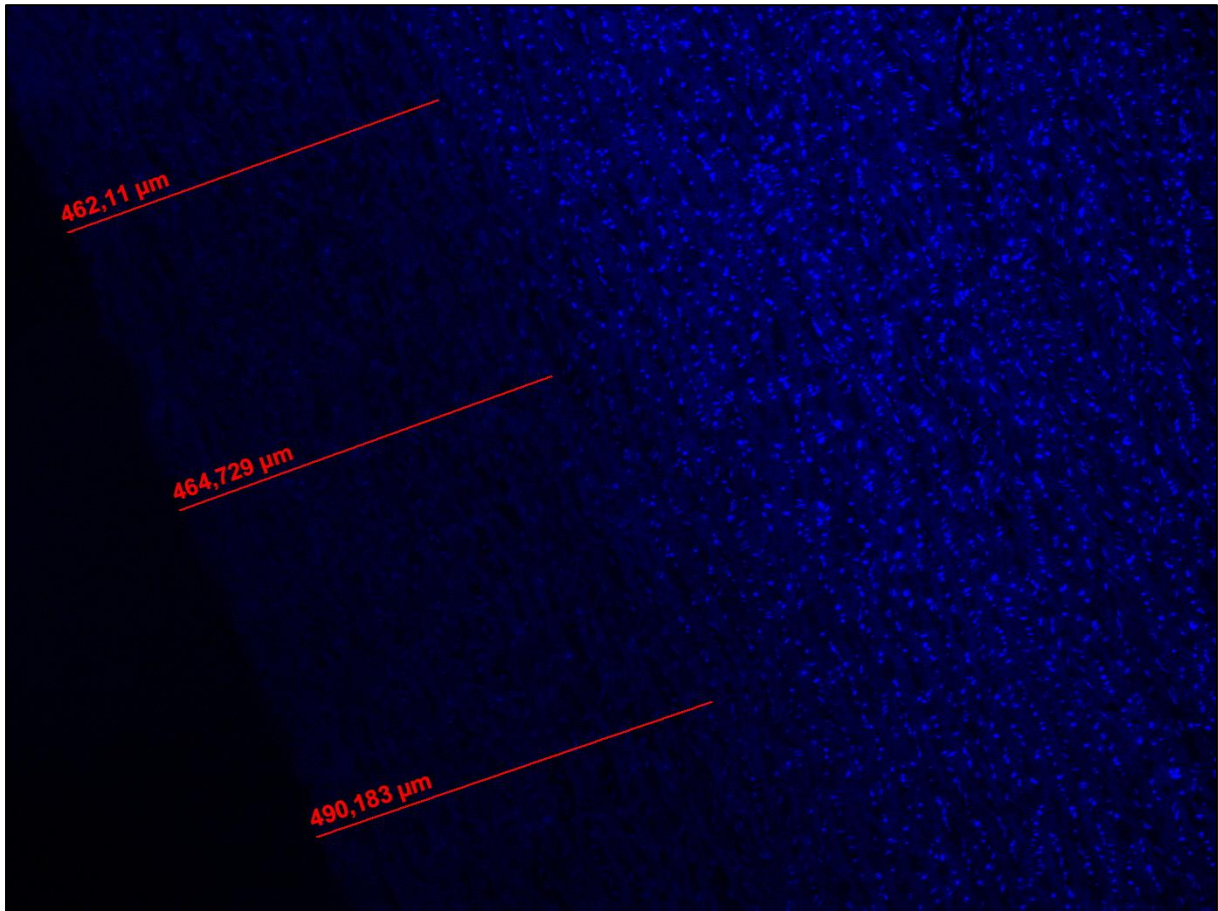


Abbildung 5-2: Repräsentative Darstellung der EDT Messung in DAPI Fluoreszenzaufnahmen. Jeweils drei senkrecht zur Oberfläche stehende Distanzen wurden vermessen. Aus diesen wurde anschließend der Mittelwert für die jeweilige Oberfläche der Versuchsprobe errechnet. Die Abbildung zeigt die Vermessung der inneren Oberfläche der AW Nr. 5 aus G_c-24h.

5.3 Hämatoxylin-Eosin

5.3.1 Allgemeines

Die für die H&E Färbung verwendeten Farbstoffe Hämalaun und Eosin binden an eine Vielzahl verschiedener Gewebekomponenten. So lagert sich das basische und blaue Hämalaun an allen basophilen Zellsubstanzen an. Besonders stark werden folglich saure Kernstrukturen wie die DNA angefärbt. Das saure Eosin hingegen färbt alle azidophilen Bestandteile des Gewebes an. Somit erscheinen Mitochondrien, Proteine des Zytoplasmas und vor allem Kollagen rötlich. [143] Dem Färbeverhalten entsprechend erlaubt die H&E Färbung Aussagen über die Anwesenheit von Kern- und EZM Strukturen. Dadurch ermöglichte die H&E Färbung neben der Bestätigung der DAPI Ergebnisse einen ersten Eindruck über den Erhalt der Gewebestruktur.

5.3.2 Färbeprotokoll und Mikroskopie

Nach der Entparaffinierung spülten wir die Schnitte zunächst für 2 x 3 min mit AD. Im Anschluss daran fand die fünfminütige Kernfärbung mittels Hämalaun (Mayer's Hämalaunlösung, Merck KGaA), 1:3 mit PBS verdünnt, statt. Gefolgt wurde diese von einer einminütigen Inkubation mit Salzsäure Lösung 0,1 Vol.-% (HCl, Merck KGaA) und bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min. Anschließend wurde für 5 sek mit Eosin (Eosin Y solution alcoholic, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gegengefärbt, bevor wieder für 3 min mit Leitungswasser gewaschen wurde. Danach tauchten wir die Objektträger zur Differenzierung mehrfach in Ethanol 80 Vol.-% und inkubierten diese für 2 x 2 min mit Ethanol 100 Vol.-%. Abschließend wurden die Schnitte für 4 min in Xylol (Xylol (Isomere), Carl Roth GmbH + Co.KG) getaucht und für die dauerhafte Lagerung vorbereitet (**s. Tab. 5-3**).

Die Aufnahme der H&E Bilder erfolgte mithilfe eines Lichtmikroskops (Leica DMR, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar GER) und einer Bildsoftware (Ascent software version 2.6, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) in 50 x und 100 x Vergrößerung.

Tabelle 5-3: Färbeprotokoll der H&E Färbung.

H&E Färbeprotokoll	
Entparaffinieren	
Schritt	Dauer
AD	2 x 3 min
Hämalaunlösung (1:3 in PBS)	1 x 5 min
HCL Lösung 0,1 Vol.-%	1 x 1 min
Leitungswasser fließend	1 x 10 min
Eosin	1x 5 sek
Leitungswasser	1 x 3 min
Ethanol 80 Vol.-%	mehrmals eintauchen
Ethanol 100 Vol.-%	2 x 2 min
Xylol	1 x 4 min
Eindecken	
Mikroskopieren	

5.4 Movat Pentachrom

5.4.1 Allgemeines

Die MPC Färbung erlaubt die Darstellung sämtlicher Bindegewebskomponenten in einem Bild. Dabei werden Muskeln rot, Kollagen gelb und elastische Fasern rot gefärbt. Weitere, nicht differenziert anfärbbare Bestandteile der EZM, stellen sich als Grundsubstanz blau-grün dar. Knorpel- und Knochengewebe können ebenso dargestellt werden, hatten jedoch für die hier genannten Versuche keine Bedeutung. Zusätzlich zu den Komponenten des Bindegewebes werden Zellkerne rot-schwarz angefärbt. [144] Mithilfe der MPC Bindegewebsfärbung war es möglich, die komplette Matrixstruktur der behandelten AW abzubilden und deren Erhalt oder Beschädigung im Vergleich mit Nativproben zu beurteilen.

5.4.2 Färbeprotokoll und Mikroskopie

Gefärbt wurden die Proben gemäß des Färbeprotokolls und mit den Färbemitteln des Herstellers (Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Färbeprotokoll für Movat Pentachrom). Nach Entparaffinierung färbten wir die Schnitte für 12 min mit Alcianblau 1 Vol.-%. Getrennt durch Spülschritte in fließendem Leitungswasser für 5 min und für 10 min wurden die Schnitte für 60 min in alkalischem Alkohol differenziert und anschließend für 10 min in Weigerts Eisenhämatoxylin kerngefärbt. Bevor die weiteren Färbeschritte stattfanden, führten wir einige vom Hersteller empfohlene Sonderschritte durch. Diese waren ab Schnittdicken $>4 \mu\text{m}$ vorgesehen und stellten sicher, dass die Qualität der Färbung unabhängig von der Schnittdicke gewährleistet war. Hierzu wurden die Schnitte mit Eisen (III)-Chlorid-Lösung (3 min) und Natriumthiosulfat (1 min) behandelt. Vor, zwischen und nach diesen beiden Inkubationen fanden je einminütige Spüleinheiten in AD statt. Nach Absolvierung der Sonderschritte wurde für 15 min in fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend fanden Inkubationen mit Brilliant-Crocein-Säurefuchsin (10 min), Essigsäure 1 Vol.-% (30 sek), Phosphorwolframsäure 5 Vol.-% (20 min) und erneut Essigsäure 1 Vol.-% (2 min) statt. Danach wurden die Schnitte in Ethanol 99 Vol.-% entwässert (1+6 min) und für 6 min in Safron du Gateis gefärbt. Den Abschluss des Protokolls bildeten Inkubationen mit Ethanol 99 Vol.-% (2 x 2 min), Isopropanol (2 min) und Xylol (2 x 5 min) (**s. Tab. 5-4**).

Die mikroskopische Auswertung erfolgte analog zur H&E Färbung mithilfe 50 x und 100 x vergrößerter lichtmikroskopischer Aufnahmen.

Tabelle 5-4: Färbeprotokoll der MPC Färbung.

MPC Färbeprotokoll	
Entparaffinieren	
Schritt	Dauer
Alcianblau 1 Vol.-%	1 x 12 min
Leitungswasser fließend	1 x 5 min
Alkalischer Alkohol	1 x 60 min
Leitungswasser fließend	1 x 10 min
Eisenhämatoxylin	1 x 10 min
AD	1 x 1 min
Eisen (III)-Chlorid-Lösung	1 x 3 min
AD	1 x 1 min
Natriumthiosulfat	1 x 1 min
AD	1 x 1 min
Leitungswasser fließend	1 x 15 min
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	1 x 10 min
Essigsäure 1 Vol.-%	1 x 30 sek
Phosphorwolframsäure 5 Vol.-%	1 x 20 min
Essigsäure 1 Vol.-%	1 x 2 min
Ethanol 99 Vol.-%	1 x 1 min
Ethanol 99 Vol.-%	1 x 6 min
Safron du Gateis	1 x 6 min
Ethanol 99 Vol.-%	2 x 2 min
Isopropanol	1 x 2 min
Xylol	2 x 5 min
Eindecken	
Mikroskopieren	

5.5 Pikro-Siriusrot

5.5.1 Allgemeines

Die Kollagenfasern wurden zusätzlich zu MPC mittels PSR Färbungen dargestellt. Das Besondere an dieser Färbemethode ist die Tatsache, dass die Schnitte sowohl im Licht- als auch Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden können. Im Lichtmikroskop erscheint Kollagen rötlich, während sich Muskelfasern und Zytoplasma gelblich darstellen. Im Fluoreszenzmikroskop können durch Anregung mit Licht verschiedener Wellenlängen Kollagen und autofluoreszierendes Material wie zelluläre Komponenten und elastische Fasern voneinander unterschieden werden. [145, 146] Die PSR Färbemethode ermöglichte somit die Beurteilung der Kollagen- und Gesamtstruktur der AW.

5.5.2 Färbeprotokoll und Mikroskopie

Auch für PSR verwendeten wir Anleitung und Lösungen eines kommerziellen Färbekits (Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Färbeprotokoll für PSR für Kollagen I und III). Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte mit Weigerts Eisenhämatoxylin für 8 min kerngefärbt. Anschließend fanden spülen in AD (5 sek), bläuen in fließendem Leitungswasser (10 min) und spülen in AD (1 min) statt. Danach färbten wir die Schnitte für 1 h mit dem Farbstoff Siriusrot und spülten diese anschließend in Essigsäure 30 Vol.-% für je 2 x 1 min. Zum Abschluss des Protokolls wurden die Schnitte mit Ethanol 96 Vol.-% (2 x 4 min), Isopropanol (4 min) und Xylol (2 x 10 min) entwässert (**s. Tab. 5-5**).

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte wie bereits für die H&E und MPC Färbungen beschrieben in 50 x und 100 x Vergrößerung. In der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung der Schnitte wurde mit Anregungswellenlängen von 558 nm Kollagen rot (Rhodamin Kanal, Emissionswellenlänge 583 nm) und 470 nm autofluoreszierendes Material wie zelluläre Komponenten und elastische Fasern grün (Fluoreszein Kanal, Emissionswellenlänge 509 nm) dargestellt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden ebenfalls in 50 x und 100 x Vergrößerung angefertigt.

Tabelle 5-5: Färbeprotokoll der PSR Färbung.

PSR Färbeprotokoll	
Entparaffinieren	
Schritt	Dauer
Eisenhämatoxylin	1 x 8 min
AD	1 x 5 sek
Leitungswasser fließend	1 x 10 min
AD	1 x 1 min
Siriusrot	1 x 1 h
Essigsäure 30 Vol.-%	2 x 1 min
Ethanol 96 Vol.-%	2 x 4 min
Isopropanol	1 x 4 min
Xylol	2 x 10 min
Eindecken	
Mikroskopieren	

5.6 Probenlagerung

Die Lagerung der histologisch (H&E, MPC, PSR) gefärbten Paraffinschnitte erfolgte für alle Proben gleich. Nach Abschluss des jeweiligen Färbeprotokolls wurden die Objektträger mittels Eindeckmedium (Leica CV MOUNT, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, GER) und Eindeckgläsern (Thermo SCIENTIFIC, Gerhard Menzel GmbH) konserviert. Die DAPI gefärbten Paraffinschnitte wurden aufgrund der Photosensitivität des Farbstoffes unmittelbar nach Durchführung der Färbung mikroskopiert und nicht für die langfristige Lagerung eingedeckt.

5.7 Rasterelektronenmikroskopie

5.7.1 Allgemeines

Mithilfe der REM ist es möglich, hochauflösende Aufnahmen von Oberflächenstrukturen anzufertigen. Dazu werden sogenannte Primärelektronen im Hochvakuum als gebündelter Elektronenstrahl über das zu untersuchende Objekt geführt. Dabei erzeugen die Primärelektronen unter anderem Sekundärelektronen, Rückstreuelektronen sowie Röntgenstrahlen. Diese Wechselwirkungen zwischen Primärelektronen und Objekt werden mithilfe verschiedener Detektoren erfasst und ermöglichen in ihrer Gesamtheit die Errechnung der Oberflächentopographie des untersuchten Objekts. [147, 148] Damit die Oberflächen der AW rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden konnten, mussten zunächst bestimmte Vorbereitungsprozeduren durchgeführt werden. Hierzu wurden die Gewebestücke nach Abschluss der DZ zunächst für mindestens 48 h mit Fix-II-Lösung inkubiert (s. 4.3 Weiterverarbeitung der Proben). Dies diente der Sicherstellung einer ausreichenden Stabilität für die weiteren Bearbeitungsschritte. Im Rahmen dieser wurden die Proben mithilfe einer Alkoholreihe entwässert und anschließend Kritisch-Punkt-getrocknet. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die Proben keinerlei Wasser mehr enthielten. Dies war essenziell, um unkontrollierte Verdampfungsvorgänge während der REM Aufnahmen im Vakuum zu verhindern. Die vollständig getrockneten Proben konnten anschließend leitfähig und damit mikroskopierbar gemacht werden.

Für den Vorgang des Trocknens wurde das Prinzip des Kritisch-Punkt-Trocknens angewandt. Dieses sieht eine kontrollierte Trennung von Flüssigkeit und Feststoff vor, ohne dabei den Proben Schaden zuzufügen. Dazu wird die im Feststoff enthaltene Flüssigkeit in einer Druckkammer sukzessive durch ein hierfür vorgesehenes flüssiges Medium ersetzt. Anschließend wird die Systemtemperatur auf einen Wert jenseits des kritischen Punktes dieses Mediums erhöht. Dadurch liegt das Medium, bei entsprechendem Systemdruck, als sogenanntes überkritisches Fluid vor. In diesem Zustand sind Flüssigkeits- und Gasform des Mediums nicht mehr unterscheidbar. Mit Erreichen dieses Aggregatzustandes werden unkontrollierte Verdampfungs- oder Verdunstungsprozesse, welche Schäden an den Proben verursachen könnten, verhindert. Im letzten Schritt wird, bei konstanter Temperatur, der Kammerdruck durch Ablassen des Gases langsam auf Umgebungsdruck abgesenkt. Anschließend können die getrockneten Proben entnommen werden. [149]

Nach Abschluss des Trocknens konnten die Proben mit leitfähigem Material beschichtet werden. Dazu wurden die Proben im Vakuum mit Goldatomen bedampft. Mit Herstellung der Leitfähigkeit der Proben war die Vorbereitung zur REM abgeschlossen und die Oberflächen der AW konnten auf ultrastrukturelle Veränderungen untersucht werden.

5.7.2 Probenvorbereitung

Von den in Fix II Medium fixierten Aortenstücken wurde je ein ca. 5 x 5 mm großes Stück ausgeschnitten und so in einem Metallzylinder platziert, dass die luminale Fläche der AW nach oben zeigte. In dieser Ausrichtung verblieben die AW bis zum Abschluss der Vorbereitungsprozesse. So konnten die beiden Oberflächen der AW vor Durchführung der REM Aufnahmen eindeutig identifiziert werden.

Alkoholreihe

Um die Proben von der Fix II Lösung zu entwässern, führten wir eine aufsteigende Alkoholreihe durch. Diese beinhaltete je zehnmütige Inkubationen mit Ethanol 30, 50, 70 und 2 x 96 Vol.-%, wobei sich die Proben im Metallzylinder zu jeder Zeit in Immersion befanden. Dies wurde durch nicht vollständiges Ablassen des Ethanols und sofortiges Wiederauffüllen mit der höher konzentrierten Lösung realisiert. Nach Abschluss der Alkoholreihe überführten wir den Metallzylinder unmittelbar in unvergälltes Ethanol 99,9 Vol.-%, welches auf -20 °C vorgekühlt war. Dieses wurde als Basismedium für den Prozess des Kritisch-Punkt-Trocknens benötigt.

Kritisch-Punkt-Trocknen

Für die Durchführung des Kritisch-Punkt-Trocknens verwendeten wir CO₂, dessen kritischer Punkt bei 31 °C und ca. 74 bar liegt. Zu Beginn wurde der Metallzylinder in eine mit Ethanol 99,9 Vol.-% gefüllte Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners (Critical point dryer CPD30, BalTec, Schalksmühle, GER) gesetzt, welche anschließend luftdicht verschlossen wurde. Nach Kühlen des Systems auf eine Ausgangstemperatur von 8 °C, ersetzten wir das Ethanol sukzessive und vollständig durch flüssiges CO₂. Im Anschluss daran wurden die Temperatur auf 42 °C und der Druck auf 80 bar angehoben. Damit lagen Temperatur- und Druckwerte jenseits des kritischen Punktes von CO₂. Nach Erreichen der vorgegebenen Werte wurde das Gas über mindestens 30 min langsam

abgelassen. Danach waren die Proben vollständig getrocknet und konnten aus dem Gerät sowie aus dem Metallzylinder entnommen werden. Die getrockneten Proben teilten wir in zwei Hälften. Die Hälften wurden anschließend je einmal mit der Innen- und einmal mit der Außenfläche der AW nach oben auf Probenteller geklebt. Somit konnten Aufnahmen beider Oberflächen der AW angefertigt werden.

Sputtern

Um die Oberflächen der AW leitfähig zu machen, wurden diese zum Abschluss der Vorbereitung mithilfe eines Sputtergeräts (Sputter Coater SCD 50, BalTec) mit Goldatomen bedampft. Dazu erzeugten wir im Gerät zunächst ein Vakuum von mindestens 5×10^{-2} mbar, welches geringe Mengen an Argongas enthielt. Das Edelgas wurde benötigt, um nach Anlegen der Spannung (570 V) Atome aus der Goldkathode (28 mA) auszulösen. Der Gesamtprozess dauerte 180 sek, in welchen die Proben mit einer ausreichend dicken Schicht Gold bedeckt wurden. Nach Abschluss des Sputtervorgangs konnte das Gerät entlüftet und die leitfähigen Proben entnommen werden.

5.7.3 Mikroskopie

Zur Durchführung der REM Aufnahmen befestigten wir die vorbereiteten Probenteller im Mikroskop (Zeiss EVO LS10, Carl Zeiss AG) und verschlossen das System luftdicht. Dank des Entwässerns und Trocknens führte das anschließende Anlegen des Vakuums zu keinerlei Phasenübergängen von Flüssigkeit und damit zu keinerlei Schäden an den Proben. Somit konnten beide Oberflächen der AW untersucht und dabei repräsentative Bereiche ausgewählt werden. Von diesen fertigten wir jeweils 100 x, 500 x, 1000 x, 2000 x und 5000 x Vergrößerungsaufnahmen an. Für den Vergleich der verschiedenen Gruppen, Inkubationsschemata und -dauern sollten die Aufnahmen der luminalen Oberflächen verwendet werden. Diese waren bei der initialen Materialbearbeitung nicht präpariert worden. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass sämtliche Veränderungen zu nativen AW durch die DZ Prozeduren bedingt waren.

5.8 Statistische Auswertung

Zur Überprüfung, ob die in DAPI gemessenen EDT adäquat durch eine Normalverteilung beschrieben wurden, wendeten wir den Anderson-Darling Test an. Mithilfe dieses Tests war feststellbar, ob die Häufigkeitsverteilung der Daten der Stichproben von einer Normalverteilung abwich. [150] Bei Verwendung von Mittelwerten wurden diese als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermittelten wir mithilfe des ungepaarten t-Tests. Die errechneten Werte bezeichneten wir als signifikant bei $p < 0,05$, hoch signifikant bei $p < 0,01$ und höchst signifikant bei $p < 0,001$.

6 ERGEBNISSE

6.1 pH-Messwerte

Die pH-Werte der DZ Lösungen wurden in G_c , G_1 und G_2 stündlich kontrolliert. Hierbei zeigten sich in allen drei Gruppen, unabhängig von Inkubationszeit und -schema, sinkende pH-Werte der DZ Lösung (**s. Tab. 6-1, Anhang pH-Messwerte**). Die stärksten Abfälle der pH-Werte waren gruppenübergreifend nach 8 h kontinuierlicher DZ festzustellen (**s. Tab. 6-1**). Da von den jeweils sechs zu behandelnden AW nur drei pro Durchgang dezellularisiert wurden, erstellten wir zwei Messreihen pro Gruppe. Die Analyse der pH-Wert Veränderungen nach 8 h kontinuierlicher DZ zeigte, dass diese in der ultraschall-exponierten Gruppe (G_2) deutlicher ausgeprägt waren als in der Schüttel- (G_c) und Flussgruppe (G_1). Dabei waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant. Vielmehr rangierten die pH-Wert Veränderungen (Δ pH) in allen drei Gruppen in vergleichbaren Bereichen und beschränkten sich auf $\leq 2,3$ % Differenz zum Ausgangswert der DZ Lösung (pH = 7,67). Im Hinblick auf die stärkeren Abfälle der pH-Werte in G_c verglichen mit G_1 sei darauf hingewiesen, dass die Volumina an DZ Lösung in G_1 und G_2 (je 1,7 l) größer waren als in G_c (0,5 l).

Die pH-Werte nach 4 h kontinuierlicher, 4 h zyklischer und 8 h zyklischer DZ zeigten vergleichbare Ergebnisse. Auch hier waren die Veränderungen des pH-Wertes in G_2 meist geringfügig stärker ausgeprägt als in G_c und G_1 . Gleichzeitig ließen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen erkennen.

Tabelle 6-1: pH-Messwerte aus G_c, G₁, G₂ während und nach 8 h kontinuierlicher DZ. Da nur drei AW pro Durchgang dezellularisiert wurden, waren zwei Messreihen pro Gruppe erstellt worden.

	G _c		G ₁		G ₂	
Zeit	AW 1-3	AW 4-6	AW 1-3	AW 4-6	AW 1-3	AW 4-6
0 h	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67
1 h	pH = 7,62	pH = 7,62	pH = 7,64	pH = 7,63	pH = 7,65	pH = 7,64
2 h	pH = 7,61	pH = 7,59	pH = 7,61	pH = 7,61	pH = 7,65	pH = 7,62
3 h	pH = 7,60	pH = 7,58	pH = 7,61	pH = 7,61	pH = 7,61	pH = 7,58
4 h	pH = 7,59	pH = 7,57	pH = 7,60	pH = 7,61	pH = 7,59	pH = 7,54
5 h	pH = 7,58	pH = 7,57	pH = 7,59	pH = 7,60	pH = 7,52	pH = 7,53
6 h	pH = 7,57	pH = 7,54	pH = 7,58	pH = 7,60	pH = 7,50	pH = 7,52
7 h	pH = 7,56	pH = 7,54	pH = 7,58	pH = 7,59	pH = 7,49	pH = 7,52
8 h	pH = 7,55	pH = 7,54	pH = 7,57	pH = 7,59	pH = 7,49	pH = 7,50
Δ pH (0→8h)	-1,6 %	-1,7 %	-1,3 %	-1,0 %	-2,3 %	-2,2 %

6.2 DAPI Fluoreszenz

6.2.1 Nativproben

Um die EDT der DZ Lösung beurteilen zu können, wurden zunächst Aufnahmen der Kernverteilung nativer AW beurteilt. Diese zeigten eine homogene Distribution blauer punktförmiger Strukturen über den gesamten Querschnitt der AW (**s. Abb. 6-2 Nativprobe**). Diese durch DAPI Bindung markierten Ansammlungen an dsDNA entsprachen Zellkernen in den verschiedenen Schichten der AW. Die DAPI Aufnahmen ließen erkennen, dass unbehandelte AW auch in den Randbereichen zur inneren und äußeren Oberfläche eine große Anzahl an regelmäßig verteilten Kernen aufwies. Diese native Kernverteilung der AW galt als Vergleichsmaßstab für die behandelten Proben.

6.2.2 Behandelte Proben

Im Unterschied zu Nativproben wiesen behandelte Proben aller Gruppen und Behandlungszeiten von den Oberflächen ausgehende nicht-fluoreszierende Areale auf.

Die fehlenden DAPI Signale in diesen Bereichen zeigten die Abwesenheit größerer Akkumulationen an dsDNA an. Die Dicke dieser nicht-fluoreszierenden Schicht (=EDT) entsprach den kernfreien Bereichen der AW und spiegelte den Grad der DZ bezogen auf das Gesamtgewebe wider. Die EDT waren bei allen fünf Gruppen (G_c , G_1 , G_2 , G_3 , G_{c-24h}) und Inkubationsschemata mit einer Ausnahme (G_c : 4 h DZ) normalverteilt. Dabei waren die EDT_a der AW, abgesehen von 3 Proben (G_c : 4h AW Nr. 3 und Nr. 6; G_1 : 4h AW Nr. 5), stets größer als die EDT_i (**s. Tab. 6-2, Tab. 6-7; s. Anhang DAPI Ergebnisse**). Im Durchschnitt lag die EDT_a um $61 \pm 22 \%$ ($p < 0,05$) höher als die EDT_i (**s. Tab. 6-3, Tab. 6-7**). Im Vergleich der zu untersuchenden physikalischen Faktoren aus G_c , G_1 und G_2 zeigte die Auswertung nach 4 h kontinuierlicher Inkubation signifikant höhere EDT_a in G_1 verglichen mit G_c (19 %, $p < 0,05$; **s. Abb. 6-3 A1 – B1, Tab. 6-4**). Darüber hinaus offenbarte die Analyse nach dieser Behandlungsdauer signifikant höhere EDT_a in G_2 verglichen mit G_c (49 %, $p < 0,001$; **s. Abb. 6-3 A1 – C1, Tab. 6-4**) und G_1 (25 %, $p < 0,001$; **s. Abb. 6-3 B1 – C1**). Im Vergleich von zyklischen und kontinuierlichen Inkubationsschemata wiesen die zyklischen 4 h Protokolle in allen drei Gruppen höhere EDT_a auf als deren kontinuierliche Vergleichsschemata (G_c : +43 %, $p < 0,001$; G_1 : +39 %, $p < 0,001$; G_2 : +17 %, $p < 0,01$; **s. Abb. 6-3 A1-C1 → A2-C2, Tab. 6-5**). Zusammenfassend machte die Auswertung nach 4 h DZ deutlich, dass die Kombination aus flussabhängiger Bewegung, Ultraschall und zyklischem Inkubationsschema im Vergleich zu kontinuierlicher Inkubation im Schüttel-Inkubator zum stärksten Anstieg der EDT_a geführt hatte (74 %, $p < 0,001$; **s. Abb. 6-3 A1 – C2**).

Auch die Auswertung nach 8 h DZ Zeit zeigte im Vergleich zu G_c signifikant höhere EDT_a in G_1 (14 %, $p < 0,05$; **s. Abb. 6-3 A3 – B3, Tab. 6-4**) und G_2 (15 %, $p < 0,05$; **s. Abb. 6-3 A3 – C3, Tab. 6-4**). Darüber hinaus führte auch bei den 8 h Protokollen der Einsatz zyklischer Schemata zu signifikanten Anstiegen der EDT_a von bis zu 21 % ($p < 0,05$; **s. Abb. 6-3 A3-C3 → A4-C4, Tab. 6-5**). Die Verdopplung der Inkubationszeit (4 h → 8 h) resultierte in allen drei Gruppen in höchst signifikanten Anstiegen der EDT_a sowohl bei kontinuierlichem (G_c : 112 %, $p < 0,001$; G_1 : 103 %, $p < 0,001$; G_2 : 64 %, $p < 0,001$) als auch zyklischem (G_c : 80 %, $p < 0,001$; G_1 : 41 %, $p < 0,001$; G_2 : 62 %, $p < 0,001$) DZ Schema (**s. Tab. 6-6**). Folgend aus den bisher genannten Ergebnissen, wiesen Proben aus G_2 , welche 8 h zyklisch behandelt wurden, die größten EDT_a ($600 \pm 41 \mu\text{m}$; **s. Abb. 6-1; Abb. 6-3 C4**) der drei Gruppen auf (**s. Anhang DAPI Ergebnisse**).

Die Auswertung der EDT an den inneren Oberflächen bestätigte die eben aufgeführten Untersuchungsergebnisse. So führte auch hier die Kombination aus Fluss- und

Ultraschallbehandlung (G_2) zu größeren EDT_i als isolierte Fluss- (G_1) und Schüttelbewegung (G_c) (**s. Tab. 6-4**). Darüber hinaus führte die Verdopplung der Behandlungszeit (4 h \rightarrow 8 h) ebenfalls zu deutlichen Anstiegen der EDT_i sowohl bei kontinuierlichen (G_c : 45 %, $p < 0,05$; G_1 : 45 %, $p = 0,057$; G_2 : 72 %, $p < 0,01$) als auch bei zyklischen (G_c : 90 %, $p < 0,001$; G_1 : 107 %, $p < 0,001$; G_2 : 58 %, $p < 0,001$) Inkubationsschemata (**s. Tab. 6-6**). Folglich wiesen AW aus G_2 , welche für 8 h zyklisch dezellularisiert wurden, die größte EDT_i ($385 \pm 38 \mu\text{m}$) im Vergleich der drei Gruppen auf (**s. Abb. 6-1; Anhang DAPI Ergebnisse**).

Die Proben der weiterentwickelten DZ Prozeduren aus G_3 mit längeren Inkubationszeiten (24 h), leistungsfähigerer Pumpe, adaptierten Behandlungszyklen und intermittierendem Einsatz von Ultraschall, zeigten nochmals deutliche, höchst signifikante Anstiege der EDT (**s. Abb. 6-4**). Dabei wurde maximal eine EDT_a von $833 \pm 76 \mu\text{m}$ und eine EDT_i von $560 \pm 28 \mu\text{m}$ erreicht. Dies entsprach, im Vergleich zu den 8 h zyklisch behandelten AW aus G_2 , einer Steigerung der EDT_a um 39 % ($p < 0,001$) und der EDT_i um 46 % ($p < 0,001$). Auch im Vergleich mit der 24 h Kontrollgruppe G_{c-24h} zeigte G_3 signifikant höhere EDT (EDT_a : +31 %, $p < 0,001$; EDT_i : +23 %, $p < 0,001$) (**s. Abb. 6-1; Tab. 6-7; Anhang DAPI Ergebnisse**).

Trotz steigender EDT durch den Einsatz physikalischer (Flussbewegung, Ultraschall) und prozeduraler (längere und zyklische DZ Protokolle) DZ Methoden, zeigten die DAPI Färbungen verbleibende Kerne in allen behandelten Proben. So wurden auch nach 24 h zyklischer Behandlung in den AW aus G_3 noch deutlich Kerne angefärbt (**s. Abb. 6-4**). Im Übergangsbereich von kernfreier zu kernhaltiger Zone waren die Kerne in ihrer Signalstärke abgeschwächt, was auf geringere Mengen an residualer dsDNA in diesen Bereichen hinwies.

Tabelle 6-2: DAPI MW der EDT [μm] an den äußeren (EDT_a) und inneren (EDT_i) Oberflächen der AW aus G_c, G₁, G₂.

MW der EDT _a [μm]				
	4 h	4 h Zyklus	8 h	8 h Zyklus
G _c	213,1 ± 24,1	304,7 ± 18,1	452,6 ± 58,3	547,6 ± 91,9
G ₁	253,2 ± 28,1	351,0 ± 33,4	514,3 ± 28,2	493,7 ± 43,8
G ₂	317,1 ± 17,4	370,3 ± 32,8	519,6 ± 27,7	600,4 ± 41,2
MW der EDT _i [μm]				
	4 h	4 h Zyklus	8 h	8 h Zyklus
G _c	159,3 ± 33,2	180,0 ± 21,4	231,3 ± 67,2	341,8 ± 43,2
G ₁	186,9 ± 15,4	179,1 ± 35,1	270,6 ± 106,6	370,6 ± 14,8
G ₂	178,6 ± 60,8	244,1 ± 22,6	307,6 ± 82,9	384,5 ± 38,1

Tabelle 6-3: Differenz der MW der EDT an den äußeren (EDT_a) und korrespondierenden inneren (EDT_i) Oberflächen der AW aus G_c, G₁, G₂. Signifikanzlevels: * = p<0,05 (signifikant); ** = p<0,01 (hoch signifikant); *** = p<0,001 (höchst signifikant).

Differenz MW EDT _a - EDT _i [%]				
	4 h	4 h Zyklus	8 h	8h Zyklus
G _c	+33,8 %**	+69,3 %***	+95,7 %***	+60,2 %***
G ₁	+35,5 %***	+96,0 %***	+90,0 %***	+33,2 %***
G ₂	+77,5 %***	+51,7 %***	+68,9 %***	+56,2 %***

Tabelle 6-4: Zuwachsraten der MW der EDT an den äußeren (EDT_a) und inneren (EDT_i) Oberflächen durch Einsatz der Protokolle aus G₁ und G₂ im Vergleich zu G_c. Signifikanzlevels: * = p<0,05 (signifikant); ** = p<0,01 (hoch signifikant); *** = p<0,001 (höchst signifikant).

Zuwachsraten der EDT aus G ₁ und G ₂ zu G _c [%]				
	4 h		8 h	
	EDT _a	EDT _i	EDT _a	EDT _i
G _c → G ₁	+18,8 %*	+17,4 %	+13,6 %*	+17,0 %
G _c → G ₂	+48,8 %***	+12,1 %	+14,8 %*	+33,0 %

Tabelle 6-5: Zuwachsraten der MW der EDT an den äußeren (EDT_a) und inneren (EDT_i) Oberflächen durch Einsatz zyklischer Inkubationsprotokolle. Signifikanzlevels: * = p<0,05 (signifikant); ** = p<0,01 (hoch signifikant); *** = p<0,001 (höchst signifikant).

Zuwachsraten durch Einsatz zyklische Protokolle [%]				
	4 h → 4h zyklisch		8 h → 8h zyklisch	
	EDT _a	EDT _i	EDT _a	EDT _i
G_c	+43,0 %***	+13,0 %	+21,0 %*	+47,8 %**
G₁	+38,6 %***	-4,2%	-4,0%	+37,0 %*
G₂	+16,8 %**	+36,7 %*	+15,6 %**	+25,0 %*

Tabelle 6-6: Zuwachsraten der MW der EDT an den äußeren (EDT_a) und inneren (EDT_i) Oberflächen von 4 h zu 8 h Inkubationsdauer. Signifikanzlevels: * = p<0,05 (signifikant); ** = p<0,01 (hoch signifikant); *** = p<0,001 (höchst signifikant).

Zuwachsraten durch Verdopplung der SD-SDS Inkubationsdauer [%]				
	4 h → 8h		4 h zyklisch → 8h zyklisch	
	EDT _a	EDT _i	EDT _a	EDT _i
G_c	+112,4 %***	+45,2 %*	+79,7 %***	+90,0 %***
G₁	+103,1 %***	+44,7 %	+40,7 %***	+107,0 %***
G₂	+63,8 %***	+72,2 %**	+62,2 %***	+57,5 %***

Tabelle 6-7: DAPI EDT [µm] an den äußeren (EDT_a) und inneren (EDT_i) Oberflächen der AW aus G₃ im Vergleich zu G₂ und G_{c-24h}. Signifikanzlevels: * = p<0,05 (signifikant); ** = p<0,01 (hoch signifikant); *** = p<0,001 (höchst signifikant).

G ₃ = 24h zyklisch		G _{c-24h} = 24h	
MW EDT _a [µm]	MW EDT _i [µm]	MW EDT _a [µm]	MW EDT _i [µm]
832,6 ± 75,8	559,7 ± 28,2	638,1 ± 61,6	456,7 ± 30,8
Differenz MW EDT _a und MW EDT _i [%]			
+48,8 %***		+39,7 %***	
Unterschied MW G ₃ vs. MW G ₂ 8h zyklisch [%]			
EDT _a : +38,7 %***			
EDT _i : +45,6 %***			
Unterschied MW G ₃ vs. MW G _{c-24h} [%]			
EDT _a : +30,5 %***			
EDT _i : +22,6 %***			

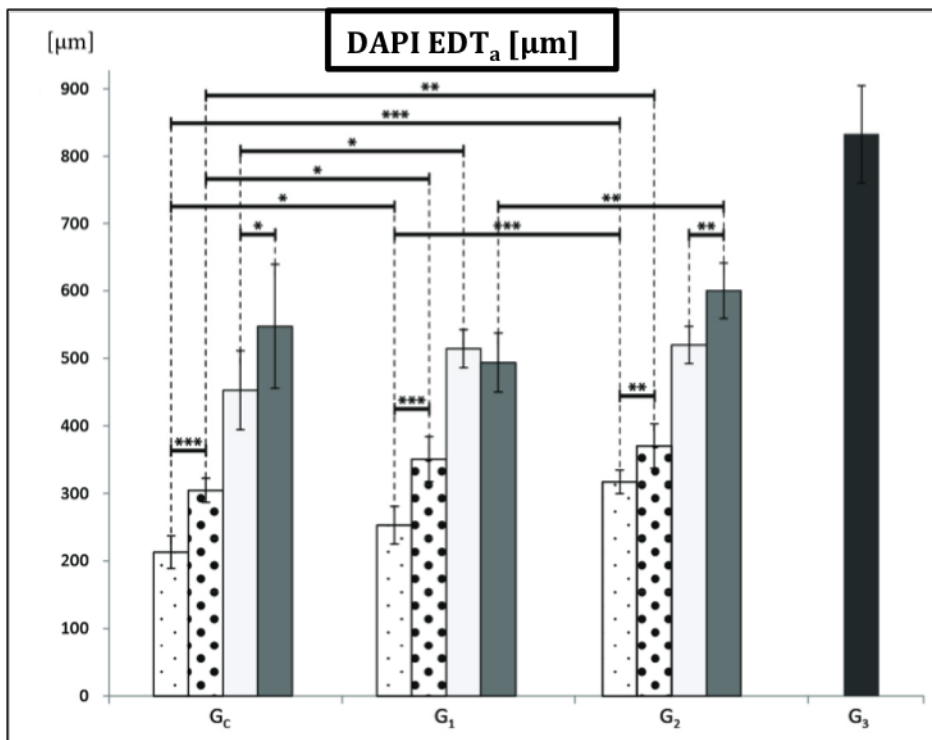
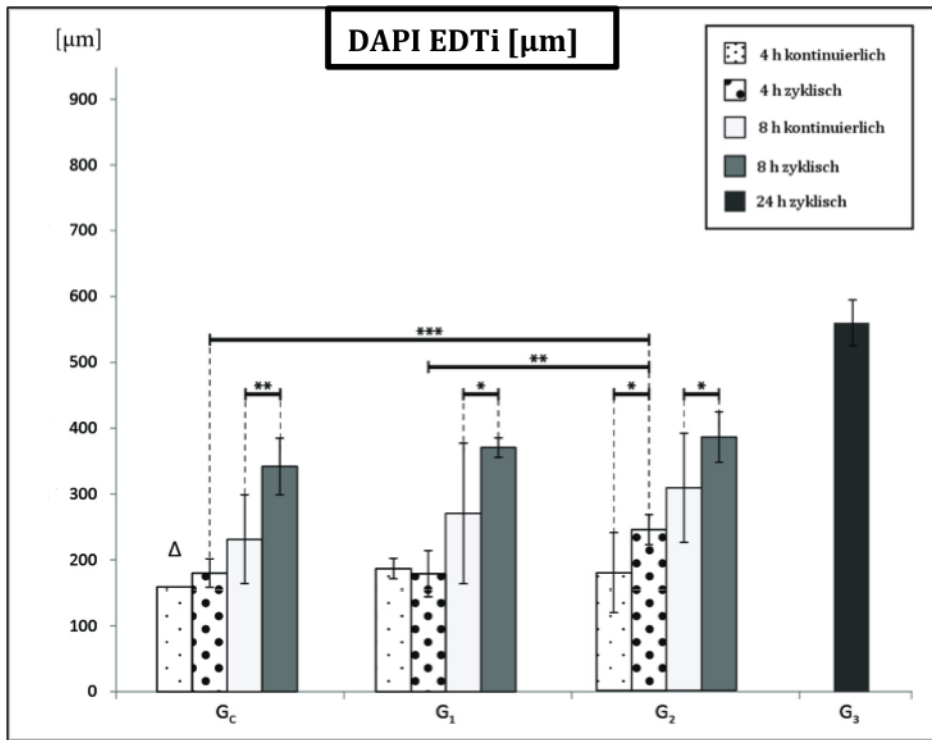


Abbildung 6-1: DAPI EDT der inneren (EDT_i) und äußeren (EDT_a) Oberflächen aus G_c, G₁, G₂ und G₃. Die Gruppen sind auf der x-Achse, die EDT jeweils auf der y-Achse der beiden Diagramme aufgetragen. Alle normal verteilten Gruppen werden als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Signifikanzlevels: * = p<0,05 (signifikant); ** = p<0,01 (hoch signifikant); *** = p<0,001 (höchst signifikant). Δ = nicht normal verteilt. In allen Gruppen waren die EDT_a höher als die EDT_i. Darüber hinaus ist erkennbar, dass zunehmende DZ Dauer, zyklische Inkubationsschemata sowie die Protokolle aus G₁, G₂ und G₃ zu steigenden EDT führten.

6.3 Hämatoxylin-Eosin

6.3.1 Nativproben

Konsistent mit den DAPI Bildern offenbarten auch die H&E gefärbten, histologischen Schnitte Kerne in allen Schichten der nativen AW. Dabei waren die Kerne auch in den oberflächennahen Randschichten zu erkennen und stellten sich als dunkelblaue, rundliche und längliche Strukturen dar. Die EZM stellte sich aufgrund der Azidophilie ihrer Komponenten rosa bis rötlich dar. Es zeigte sich eine homogene Hintergrundfärbung, welche durch die Anfärbung verschiedener, nicht differenzierbarer Matrixkomponenten zustande kam. Zusätzlich zu dieser Hintergrundfärbung waren Strukturen erkennbar, welche als glatte Muskulatur und Bindegewebsfasern eingeordnet wurden. Die länglichen Zellkerne und die umgebenden azidophil gefärbten Bereiche, wurden den Kernen und dem Zytoplasma glatter Muskulatur zugeordnet. Als Bindegewebsfasern wurden unter anderem die Strukturen mit wellenförmigem Verlauf gedeutet. Obwohl die EZM Bestandteile aufgrund ihrer Azidophilie nicht differenziert beurteilt werden konnten, war dennoch die geordnete Komposition der EZM erkennbar. Dabei ließen sich aufgrund der Anordnung der Matrixstrukturen die Schichten der AW voneinander abgrenzen. Während in Tunica Intima und Tunica Adventitia vor allem Faserstrukturen dominierten, zeigten sich in der Tunica Media größere Ansammlungen längsovaler Kerne, welche als Erkennungsmerkmal glatter Muskulatur galten. Die Oberflächen der nativen AW zeigten intakte Faserstrukturen und erschienen insbesondere an der luminalen Seite glatt. An der äußeren Oberfläche waren einige in ihrer Struktur angegriffene Faserstrukturen zu erkennen.

Die native AW, mitsamt ihrer regelmäßigen Kernverteilung und der geordneten Schichtung, diente als Ausgangs- und Vergleichsstatus für alle behandelten Proben (**s. Abb. 6-2**).

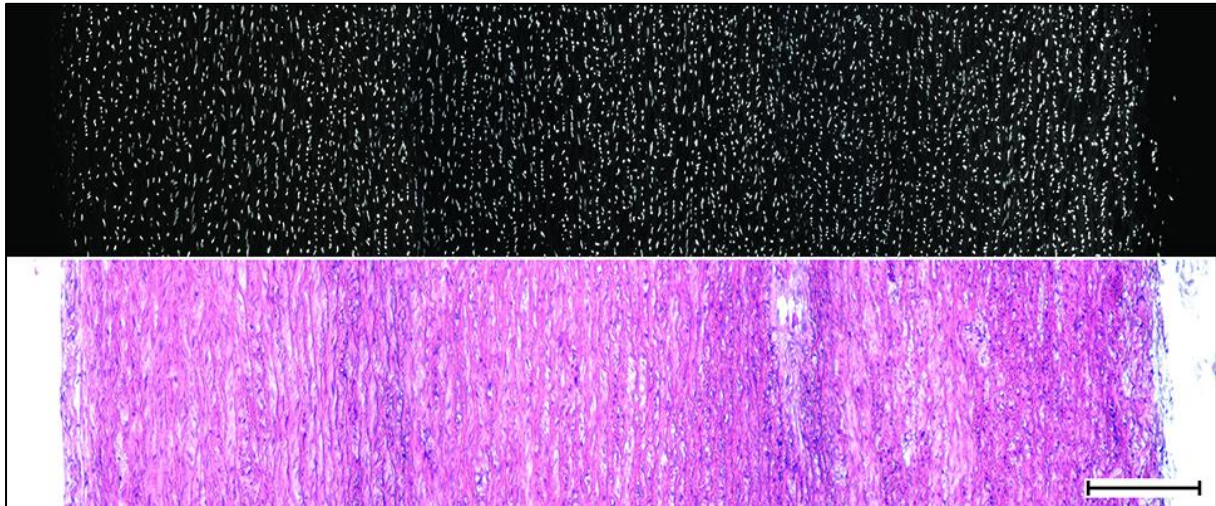


Abbildung 6-2: DAPI und H&E Färbung: Nativproben. Die Abbildungen bestehen jeweils aus 3 Einzelbildern von innerer, zentraler und äußerer Region der AW. Die Nativproben zeigten in DAPI eine homogene Kernverteilung über den gesamten Querschnitt der AW. H&E Aufnahmen der Nativprobe bestätigten die Kernverteilung und stellten die dichte Struktur der AW mit ihren verschiedenen Schichten dar. Maßstabsbalken: 400 μm .

6.3.2 Behandelte Proben

Die Auswertung der behandelten Proben ergab keine prozessbedingten Schäden an der mikroskopischen Struktur der AW. Die dezellularisierten AW wiesen allesamt den geschichteten Wandaufbau mitsamt intakt erscheinender EZM Strukturen auf. Somit konnte hierbei kein Unterschied zu den Nativproben festgestellt werden. Erkennbar war jedoch eine Aufhellung in den Randarealen der behandelten Proben. Diese Aufhellung entsprach in ihrem Ausmaß den kernfreien, dezellularisierten Arealen (**s. Abb. 6-3 A1 – C4**). Die Ausprägung der kernfreien Zonen (=EDT) diente als Bestätigung der DAPI Ergebnisse. Dabei zeigten analog zur DAPI Auswertung AW aus G₂ (**s. Abb. 6-3 C1 – C4**) größere kernfreie Bereiche als nicht ultraschallbehandelte Proben aus G₁ (**s. Abb. 6-3 B1 – B4**) und konventionell geschüttelte AW aus G_c (**s. Abb. 6-3 A1 – A4**). Darüber hinaus stellten sich erneut die Zugewinne an EDT durch zyklische Inkubationsschemata dar. Auch die Zeitabhängigkeit der EDT in Form anwachsender kernfreier Areale mit zunehmender DZ Dauer konnte bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigte die H&E analog zur DAPI Färbung, dass die Kombination aus Flussbewegung, Ultraschall und zyklischen Inkubationsschemata zu den größten EDT geführt hatte. Bei zusätzlicher Berücksichtigung des Faktors Inkubationszeit, wiesen dementsprechend AW aus G₃ die größten EDT aller Gruppen auf (**s. Abb. 6-4**). In

Übereinstimmung mit den DAPI Aufnahmen zeigten sich auch in den H&E gefärbten Schnitten verbleibende Kerne in den mittigen Bereichen der AW aller fünf Gruppen.

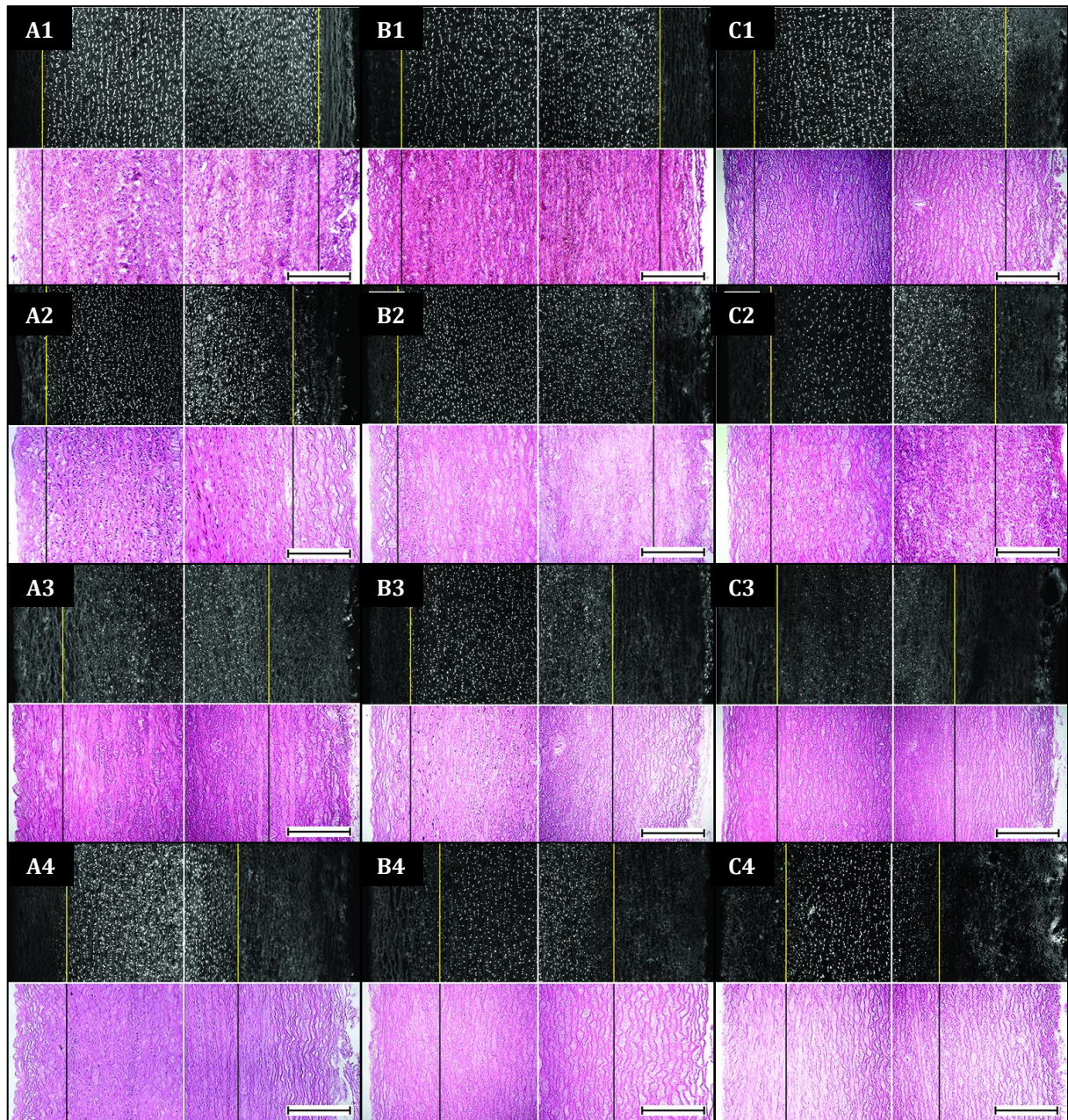


Abbildung 6-3: DAPI und H&E Färbung: A = G_c, B = G₁, C = G₂; 1 = 4h kontinuierliche DZ, 2 = 4h zyklische DZ, 3 = 8h kontinuierliche DZ, 4 = 8h zyklische DZ. Es werden jeweils Aufnahmen der Innen- und Außenseite (durch weiße Linie getrennt) dargestellt.

Alle EDT_i (linke Seite) und EDT_a (rechte Seite) sind durch gelbe (DAPI) und schwarze (H&E) Linien markiert. Alle behandelten AW zeigten in DAPI und H&E höhere EDT_a als EDT_i. Längere Inkubationszeiten führten in allen Gruppen (G_c, G₁ und G₂) zu höheren EDT (A1-C1 → A3-C3). Zyklische Schemata resultierten in höheren EDT (A1-C1 → A2-C2; A3-C3 → A4-C4) mit zwei Ausnahmen (EDT_i B2; EDT_a B4). Flussbewegung und Ultraschallbehandlung führten sowohl an äußerer als auch innerer Oberfläche zu höheren EDT (A1-4 → B1-4 → C1-4). In keiner der Gruppen waren in den H&E Schnitten Schäden an der Struktur der AW erkennbar. Maßstabsbalken: 400 µm.

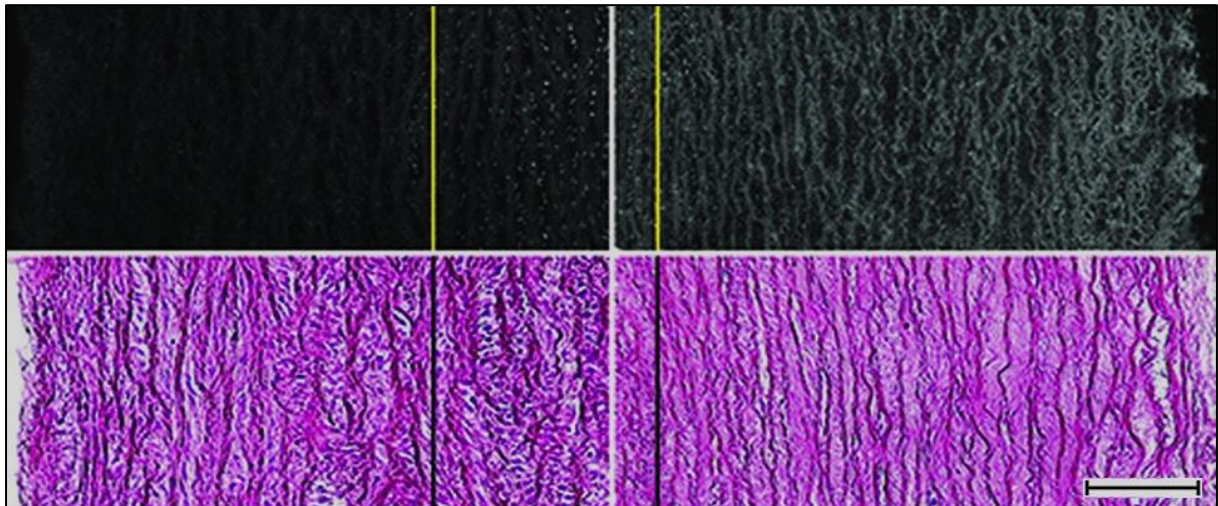


Abbildung 6-4: DAPI und H&E Färbung: AW aus G₃. Es werden jeweils Aufnahmen der Innen- und Außenseite (durch weiße Linie getrennt) dargestellt.

Die EDT_i (linke Seite) und EDT_a (rechte Seite) sind durch gelbe (DAPI) und schwarze (H&E) Linien markiert. AW aus G₃ zeigten die höchsten EDT_a und EDT_i aller Gruppen. In den zentralen Regionen der AW sind nach 24 h DZ noch deutlich Kerne erkennbar. In den H&E gefärbten Schnitten waren keine Schäden an der Struktur der AW ersichtlich. Maßstabsbalken: 400 µm.

6.4 Movat Pentachrom

6.4.1 Nativproben

MPC gefärbte Schnitte dienten zur Beurteilung der EZM Struktur der AW. Aufnahmen der unbehandelten Proben zeigten den nativen Aufbau der Aorta, bestehend aus Tunica Intima, Tunica Media und Tunica Adventitia (**s. Abb. 6-5**). Die Tunica Intima präsentierte sich mit einer glatt begrenzten, intakten inneren Oberfläche, welche sich vor allem aus endothelialen Zellen und Bindegewebe zusammensetzte. Die Kerne (rot-schwarz gefärbt in MPC) der endothelialen Zellen waren als rundliche bis längliche Strukturen, eingebettet in Kollagen (gelb gefärbt in MPC) und Grundsubstanz (blau-grün gefärbt in MPC) zu erkennen. Den Hauptteil der AW bildete die sich an die Tunica Intima anschließende Tunica Media. Die dominierenden Komponenten dieser Schicht waren elastische (rot gefärbt in MPC) und kollagene Fasern, welche von Grundsubstanz ummantelt waren. Der große Anteil an elastischen Fasern verdeutlichte die Zugehörigkeit der Aorta zu Arterien vom elastischen Typ. Den nach außen gerichteten Abschluss der AW bildete die Tunica Adventitia. Diese bestand hauptsächlich aus kollagenen Fasern und Grundsubstanz sowie den Kernen der Bindegewebszellen. Die

Fasern der äußeren Oberfläche erschienen an manchen Stellen in ihrer Struktur angegriffen. Dadurch wirkte die äußere weniger glatt berandet als die innere Oberfläche. Neben der Darstellung der EZM Komposition der AW zeigte die MPC Färbung auch die Verteilung der Kernstrukturen an. Analog zu DAPI und H&E waren hier rot-schwarze Kernstrukturen in allen Schichten der Nativproben zu erkennen (**s. Abb. 6-5**).

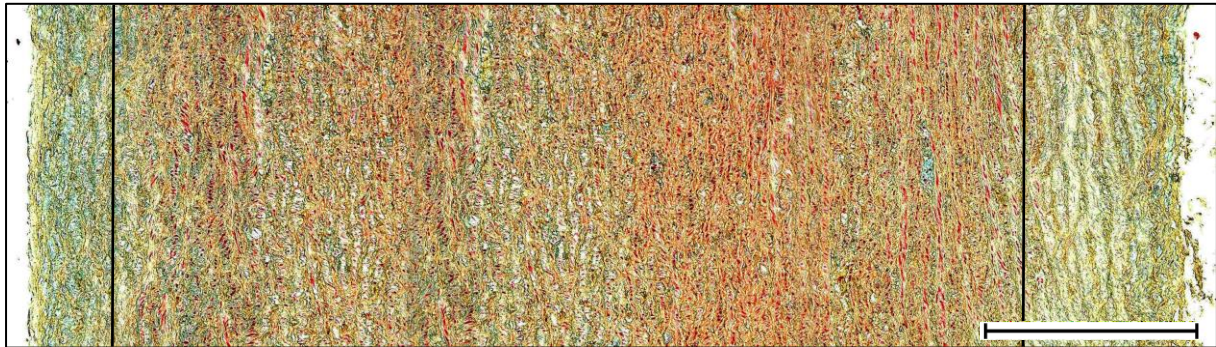


Abbildung 6-5: Movat Pentachrom Färbung: Nativproben. Die Abbildung besteht aus 3 Einzelbildern von innerer, zentraler und äußerer Region der AW. Die linke Bildhälfte entspricht jeweils der luminalen, die rechte der äußeren Oberfläche der AW. Native AW zeigten die Schichtung der AW in Tunica Intima, Media und Adventitia (durch schwarze Linien markiert) sowie intakte zelluläre und extrazelluläre Komponenten. Maßstabsbalken: 500 μm .

6.4.2 Behandelte Proben

Mithilfe der Untersuchung der behandelten Proben sollten prozessbedingte Schäden an der Struktur der AW erkannt beziehungsweise ausgeschlossen werden. Die Auswertung aller behandelten Proben belegte, dass die Schichtung der AW in ihre drei Tunicae auch nach den DZ Prozessen erhalten geblieben war. Es zeigte sich, dass sowohl die kollagenen und elastischen Fasern, als auch die Grundsubstanz in allen Gruppen erhalten werden konnten. Da längere DZ Zeiten als Risikofaktor für Schäden an der EZM gelten, wären Veränderungen an den AW aus G_c, G₁ und G₂ am ehesten nach 8 h DZ aufgetreten. Bei diesen konnten keinerlei mikroskopisch erkennbare Schäden an der Struktur der AW festgestellt werden (**s. Abb. 6-6**). Die Proben dieser DZ Zeiten wiesen genauso wie alle kürzer behandelten Proben eine glatte innere Oberfläche mit darunter liegender Kollagenschicht und Grundsubstanz auf. Die große Menge an Bindegewebsfasern und Grundsubstanz im mittleren Bereich der AW konnten ebenso erhalten werden wie die starken Kollagenbündel im äußeren Bereich der AW. Der einzig

erkennbare EZM Unterschied zu den Nativproben war eine leichte Aufhellung und damit visuell erkennbare Auflockerung der äußeren Schichten der AW. Diese Aufhellung konnte in allen behandelten Proben beobachtet werden und stellte dabei ein DZ-tiefen- und damit auch zeitabhängiges Phänomen dar. So nahm das Ausmaß der Auflockerung mit zunehmender Inkubationsdauer und EDT zu und wies demnach in G_c, G₁ und G₂ nach 8 h zyklischer Behandlungsdauer die größte Ausdehnung auf (**s. Abb. 6-6 A2, B2, C2**). Auch die 24 h behandelten Proben aus G₃ präsentierten allesamt die strukturelle Gliederung der nativen AW sowie intakte Oberflächen. Ebenso erschienen die Bindegewebsfasern, die verschiedenen Bestandteile der Grundsubstanz und die zellulären Elemente weiterhin unbeschädigt. Das zeitabhängige Phänomen der Auflockerung der äußeren Schichten nahm in den 24 h Gruppen sein größtes Ausmaß an (**s. Abb. 6-7**).

Zusammenfassend zeigte die MPC Färbung den Erhalt der Bindegewebsfasern sowie der Komponenten der Grundsubstanz. Darüber hinaus konnte die Intaktheit der glatten inneren Oberfläche für alle AW bewiesen werden. Somit waren keinerlei mikroskopisch sichtbare Veränderungen an den Komponenten der EZM festzustellen. In Übereinstimmung mit DAPI und H&E Färbung zeigte die MPC Färbung zudem Kernstrukturen in den zentralen Schichten aller AW.

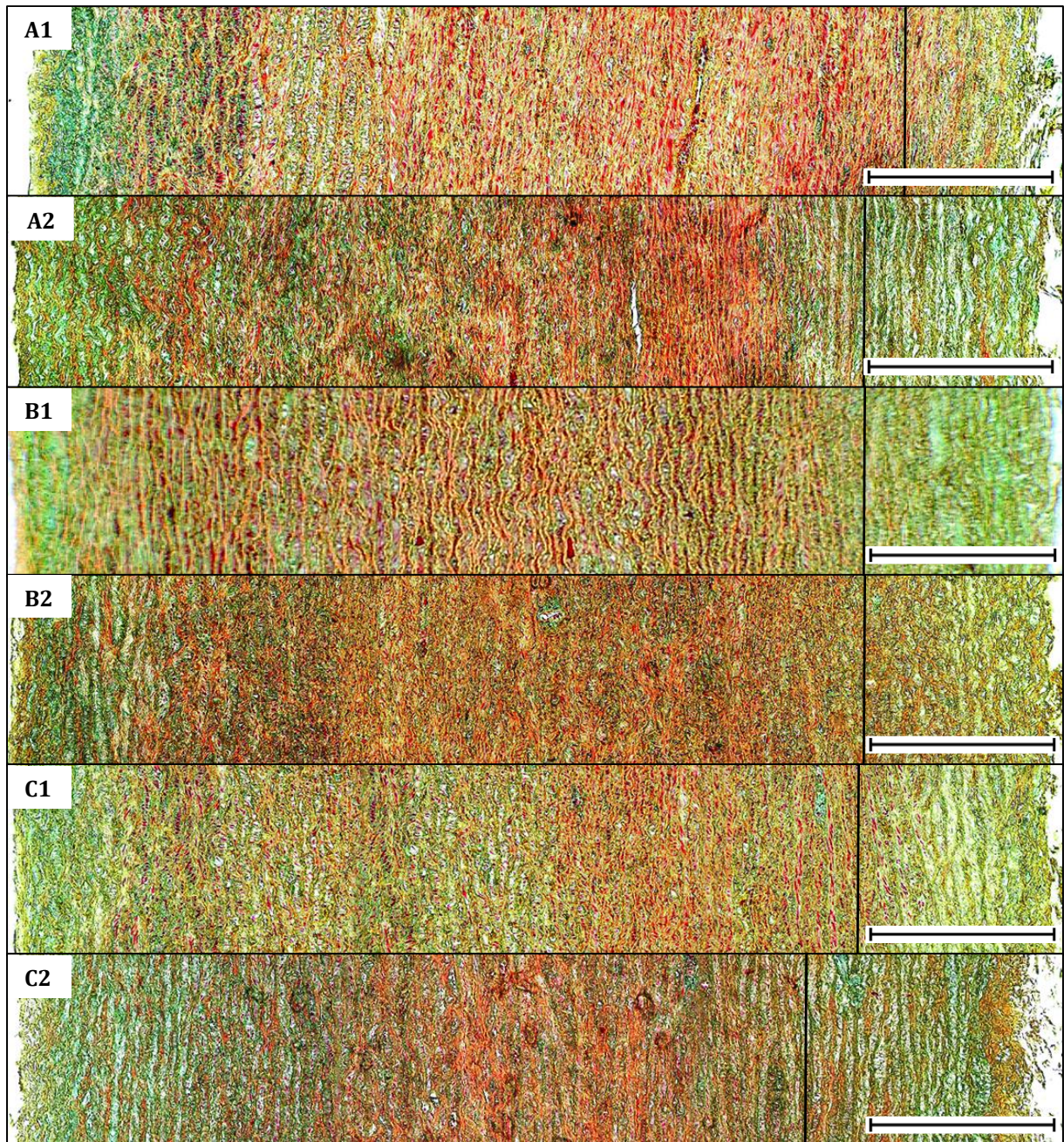


Abbildung 6-6: Movat Pentachrom Färbung: A = G_c, B = G₁, C = G₂; 1 = 8h kontinuierliche DZ, 2 = 8h zyklische DZ. Die Abbildungen bestehen jeweils aus 3 Einzelbildern von innerer, zentraler und äußerer Region der AW.

Die linke Bildhälfte entspricht jeweils der luminalen, die rechte der äußeren Oberfläche der AW. Behandelte Proben aller Gruppen zeigten intakte EZM Strukturen sowie zur Nativprobe (Abb. 6-5) vergleichbare innere und äußere Oberflächen (A1-C2). Die äußeren Schichten der behandelten AW erschienen aufgelockert (durch schwarze Linien markiert). Längere und intensivere DZ Schemata verstärkten dieses Phänomen (A1-C1 → A2-C2). Das Ausmaß der Auflockerung nahm mit zunehmender DZ Tiefe zu und deckte sich mit den kernfreien Bereichen. Maßstabsbalken: 500 µm.

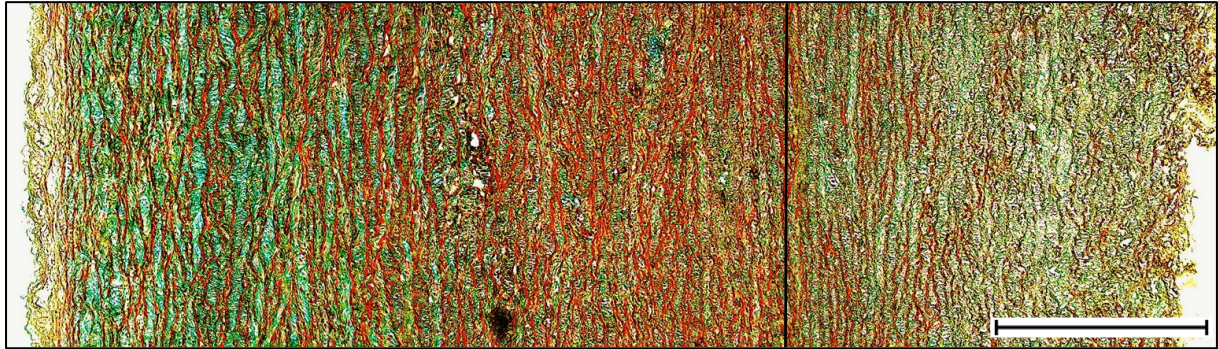


Abbildung 6-7: Movat Pentachrom Färbung: AW aus G₃. Die Abbildungen besteht aus 3 Einzelbildern von innerer, zentraler und äußerer Region der AW.

Die linke Bildhälfte entspricht jeweils der luminalen, die rechte der äußeren Oberfläche der AW. Die für 24 h dezellularisierten AW aus G₃ zeigten intakte EZM Strukturen sowie zur Nativprobe (Abb. 6-5) vergleichbare innere und äußere Oberflächen. Die äußeren Schichten der behandelten AW erschienen aufgelockert (markiert durch schwarze Linien). Das Ausmaß der Auflockerung war in den AW aus G₃ am stärksten ausgeprägt und deckte sich mit den kernfreien Bereichen. Maßstabsbalken: 500 µm.

6.5 Pikro-Siriusrot

6.5.1 Nativproben

PSR gefärbte Schnitte stellten sowohl in der licht- als auch fluoreszenzmikroskopischen Auswertung Kollagen (Lichtmikroskop: rot; Fluoreszenzmikroskop: rot bei 558 nm Anregungswellenlänge) und weitere Strukturen wie Muskelfasern, Zytoplasma und Hintergrund (Lichtmikroskop: gelb; Fluoreszenzmikroskop: grün bei 470 nm Anregungswellenlänge) dar. Aufnahmen der unbehandelten Proben offenbarten die Verteilung kollagener Fasern über den gesamten Querschnitt der AW. Hierbei ließen sich in den oberflächennahen inneren und äußeren Schichten besonders starke Akkumulationen der kollagenen Fasern finden. Die luminale Oberfläche stellte sich glatt begrenzt mit intakten kollagenen Fasern dar. Die kollagenen Fasern der äußeren Oberfläche wiesen in ihrem Verlauf Unterbrechungen auf und wirkten teils in ihrer Struktur angegriffen. Die durch die verschiedenen Matrixstrukturen bedingte Hintergrundfärbung zeigte ein gleichmäßiges licht- und fluoreszenzmikroskopisches Signal über die gesamte Fläche der AW und vervollständigte das Bild der EZM. Aufgrund der Dominanz kollagener Fasern in den oberflächennahen Schichten, war die Hintergrundfärbung dort weniger stark ausgeprägt als in den zentralen Schichten. Als

ein Bestandteil der Hintergrundfärbung ließen sich wellenförmige Strukturelemente erkennen, welche an die Form elastischer Fasern erinnerten (**s. Abb. 6-8**).

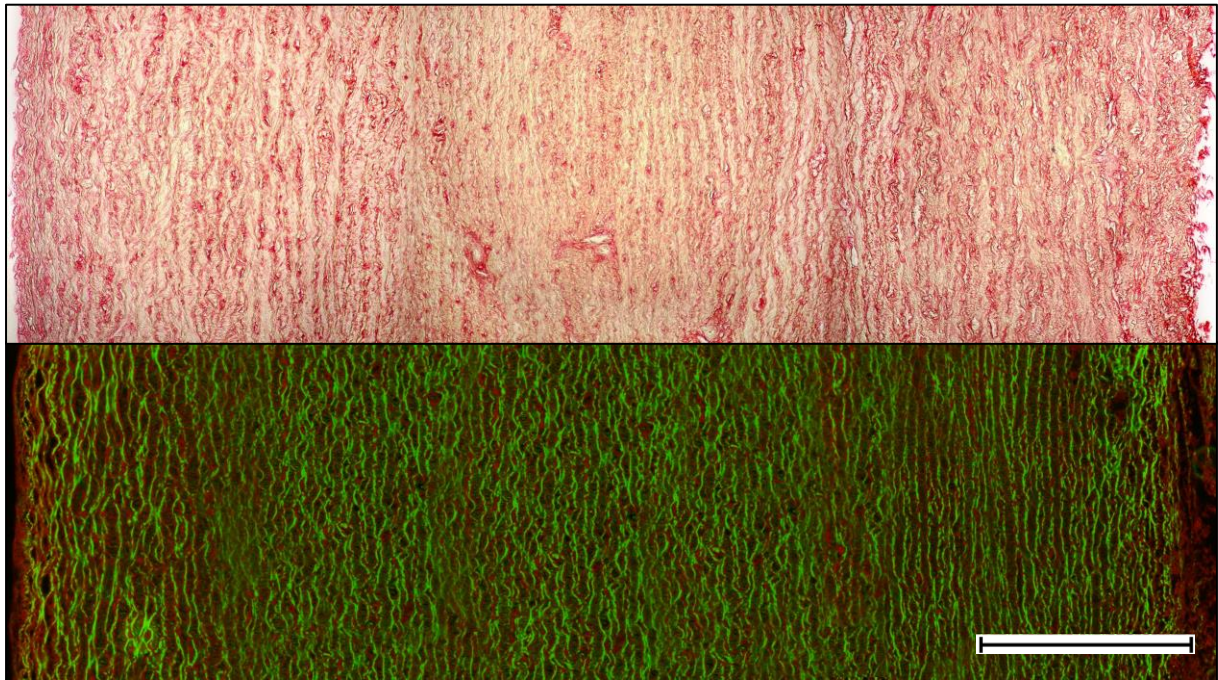


Abbildung 6-8: Picro-Siriusrot Färbung im Licht- (rot-gelb) und Fluoreszenzmikroskop (grün-rot): Nativprobe. Die Abbildungen bestehen jeweils aus 3 Einzelbildern von innerer, zentraler und äußerer Region der AW.

Die linke Bildhälfte entspricht jeweils der luminalen, die rechte der äußeren Oberfläche der AW. Native AW zeigten eine homogene Kollagenstruktur mit Akkumulation in den oberflächennahen Bereichen. Die aus EZM Komponenten resultierende Hintergrundfärbung zeigte ein gleichmäßiges Signal über den Querschnitt der AW. Maßstabsbalken: 500 µm.

6.5.2 Behandelte Proben

Die Auswertung der behandelten AW zeigte den Erhalt der kollagenen Fasern in allen Proben. Es konnten keine mikroskopisch sichtbaren Veränderungen des Kollagens beschrieben werden. Wie die nativen Vergleichsproben wiesen auch dezellularisierte AW eine regelmäßige Kollagenverteilung mit besonders faserdichten Randgebieten auf. Die Fasern erschienen sowohl in den zentralen als auch den oberflächennahen Schichten der AW intakt. Einzig die Fasern der äußeren Oberfläche zeigten, analog zu den Nativproben, in ihrem Verlauf Unterbrechungen. Die im Rahmen der MPC Auswertung beschriebene Aufhellung beziehungsweise Auflockerung der äußeren Schichten war auch in PSR gefärbten Schnitten erkennbar. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen äußerte sich dies durch einen helleren gelblichen Hintergrundton, in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern durch eine geringere Intensität der grünen

Basisfärbung. Das Ausmaß der Aufhellung nahm ebenso in Abhängigkeit von der EDT zu. Somit stellte sich diese Beobachtung in den 24 h behandelten AW aus G₃ am deutlichsten dar (**s. Abb. 6-10**). Die für native AW beschriebenen wellenförmigen Strukturelemente fanden sich auch in dezellularisierten Proben in gleicher Form und Intensität wieder (**s. Abb. 6-9 A - C**).

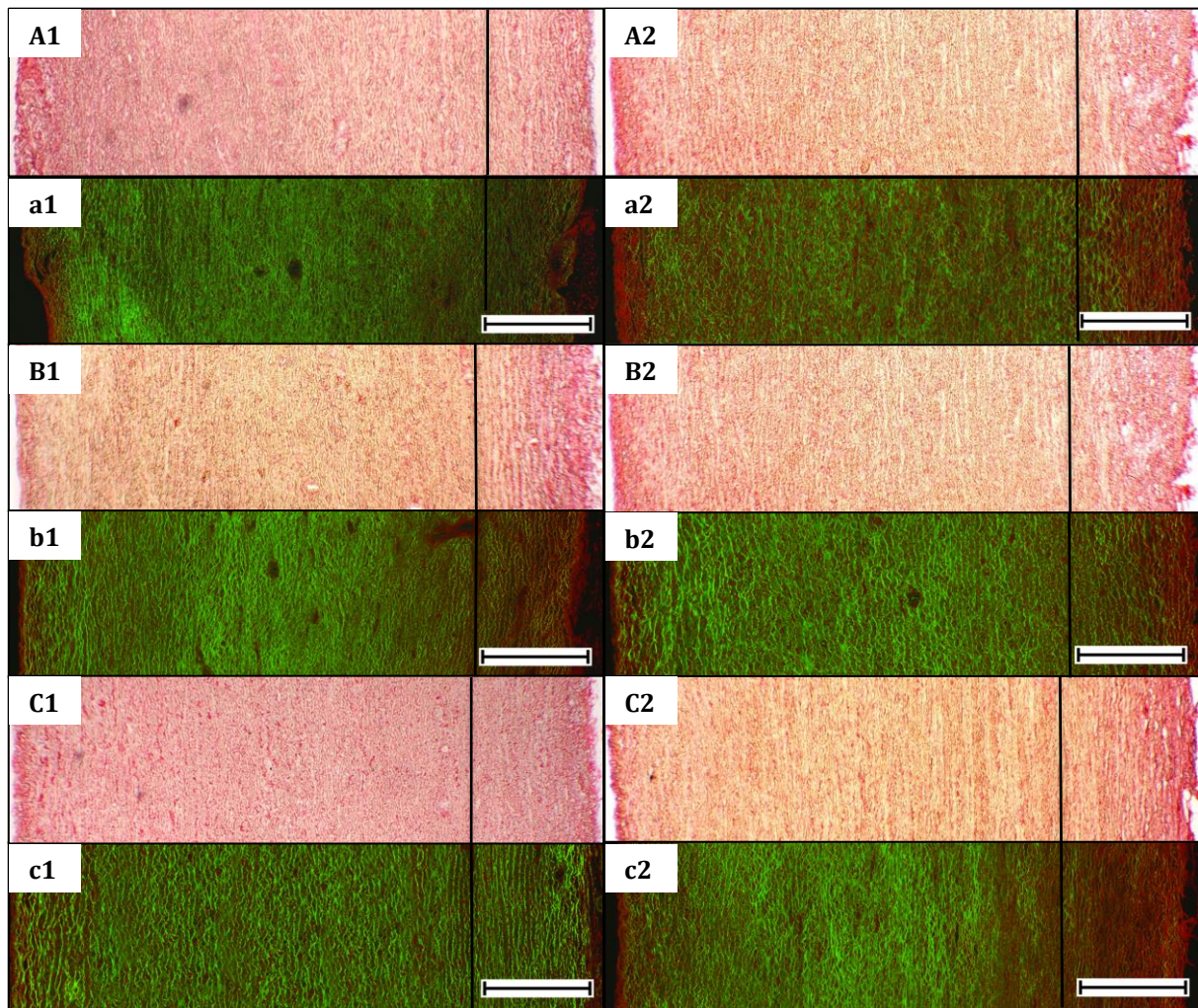


Abbildung 6-9: Piko-Siriusrot Färbung im Licht- (rot-gelb, große Buchstaben) und Fluoreszenzmikroskop (grün-rot, kleine Buchstaben): A/a = G_c, B/b = G₁, C/c = G₂; 1 = 8h kontinuierliche DZ, 2 = 8h zyklische DZ. Die Abbildungen bestehen jeweils aus 3 Einzelbildern von innerer, zentraler und äußerer Region der AW.

Die linke Bildhälfte entspricht jeweils der luminalen, die rechte der äußeren Oberfläche der AW. Behandelte AW zeigten eine der Nativprobe (Abb. 6-8) vergleichbare Kollagenverteilung. In den Randbereichen dezellularisierter AW zeigten sich eine Aufhellung bzw. ein Rückgang der autofluoreszierenden Hintergrundfärbung an (durch schwarze Linien markiert). Dies nahm mit zunehmender DZ Tiefe (A1/a1-C1/c1 → A2/a2-C2/c2) im Ausmaß zu. Maßstabsbalken: 500 µm.

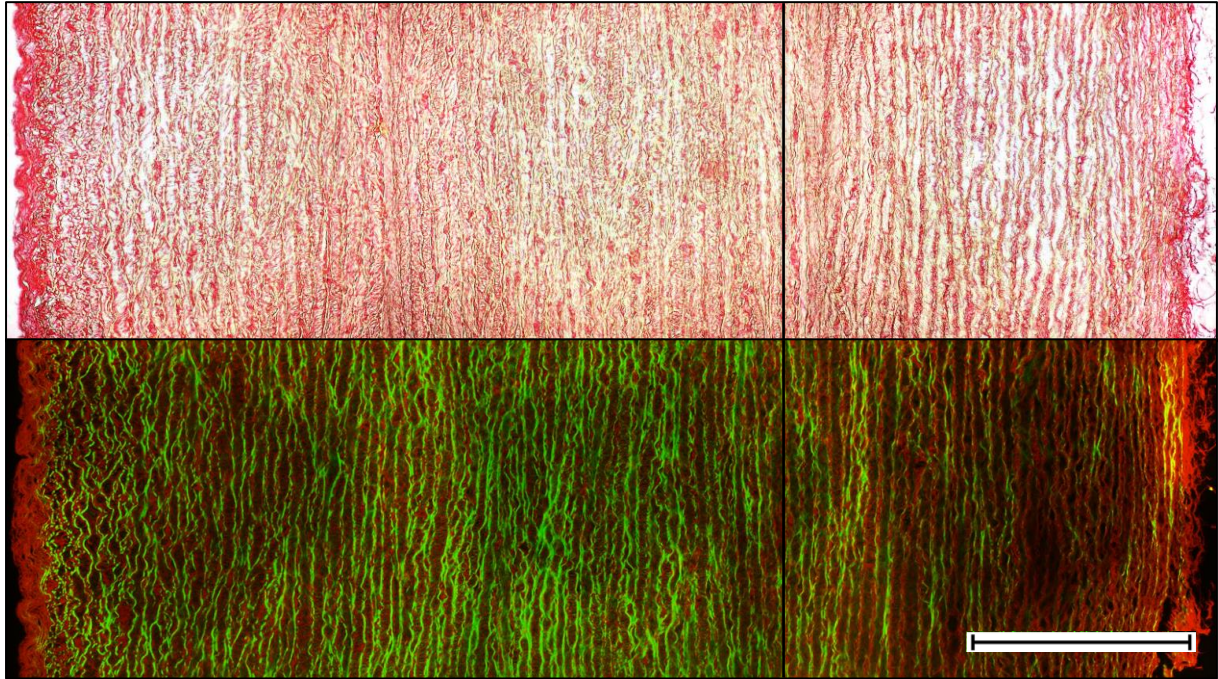


Abbildung 6-10: Pikro-Siriusrot Färbung im Licht- (rot-gelb) und Fluoreszenzmikroskop (grün-rot): AW aus G₃. DZ. Die Abbildungen bestehen jeweils aus 3 Einzelbildern von innerer, zentraler und äußerer Region der AW.

Die linke Bildhälfte entspricht jeweils der luminalen, die rechte der äußeren Oberfläche der AW. Die 24 h dezellularisierten AW aus G₃ zeigten eine zur Nativprobe (Abb. 6-8) unverändert erscheinende Kollagenstruktur. Die AW aus G₃ zeigten in den Randbereichen die Aufhellung bzw. den Rückgang der autofluoreszierenden Hintergrundfärbung am deutlichsten (durch schwarze Linien markiert). Maßstabsbalken: 500 µm.

6.6 Rasterelektronenmikroskopie

6.6.1 Nativproben

REM Aufnahmen der luminalen und äußeren Oberflächen der Nativproben dienten als Vergleichsmaterial zu denen behandelter AW. Aufnahmen der luminalen Seite ließen eine dichte, geschlossene Oberfläche erkennen (**s. Abb. 6-11 Nativprobe**). Aufnahmen der Außenseiten legten neben Bereichen geschlossener Oberfläche auch Faserstrukturen dar. Dabei waren neben dickeren, glatten Faserbündeln auch einzelne Fasern erkennbar. Diese verliefen netzartig zwischen den dickeren Bündeln und stellten sich als Abspaltungen aus jenen dar (**s. Abb. 6-12 Nativprobe**).

6.6.2 Behandelte Proben

Im Vergleich zu den nativen AW zeigten sich bereits nach 4 h kontinuierlicher SD-SDS Behandlung Veränderungen der luminalen Oberfläche. Diese äußerten sich in dem partiellen Fehlen der für native Proben beschriebenen geschlossenen Oberfläche. Folglich waren in allen behandelten AW unterhalb der Oberfläche befindliche Faserstrukturen sichtbar. Nach 4 h DZ waren hierbei lediglich wenige Faserbündel erkennbar, die noch zu großen Teilen von Oberfläche bedeckt waren. Längere Inkubationszeiten amplifizierten die Veränderungen der Oberfläche und präsentierten das Fasernetzwerk der EZM zunehmend feiner. Dieses Phänomen war in allen drei Gruppen zu beobachten (**s. Abb. 6-11 A1-C1 → A2-C2**). Folglich unterschieden sich 8 h behandelte Proben deutlicher von nativen AW als 4 h dezellularisierte AW. Auch im Vergleich der einzelnen Gruppen ließen sich Unterschiede in der Oberflächentopographie feststellen. Während AW der Schüttel-Gruppe G_c sowohl nach 4 h als auch 8 h kontinuierlicher Inkubation (**s. Abb. 6-11 A1, A2**) vor allem Areale geschlossener Oberfläche und damit stärkere Ähnlichkeit zu unbehandelten Proben aufwiesen, unterschieden sich fluss- und ultraschallbehandelte AW bereits deutlicher vom nativen Präparat. So zeigten sowohl AW aus G₁ (**s. Abb. 6-11 B1, B2**) als auch aus G₂ (**s. Abb. 6-11 C1, C2**) ein zu größeren Teilen unbedecktes Fasernetzwerk mit deutlicherer Ausprägung in den ultraschallbehandelten Proben aus G₂. Die erkennbaren Faserstrukturen waren verschieden dick und wirkten ummantelt von den verbliebenen Teilen der geschlossenen Oberfläche. Zwischen den Faserbündeln konnten bereits dünne Einzelfasern identifiziert werden. Diese waren als Abspaltungen aus den dickeren Faserbündeln zu erkennen und zweigten sich netzartig auf. Trotz der zunehmenden Einsicht auf das Fasernetzwerk, waren in allen AW nach wie vor große Bereiche geschlossener Oberfläche zu erkennen. Neben den gruppenspezifischen Veränderungen der Oberflächenstruktur der AW waren eindeutige Unterschiede zwischen kontinuierlich und zyklisch behandelten Proben zu erkennen. In allen drei Gruppen war das Fasernetzwerk nach 8 h zyklischer DZ im Vergleich zu kontinuierlicher DZ verstärkt sichtbar. AW aus G₁ (**s. Abb. 6-11 B3**) und G₂ (**s. Abb. 6-11 C3**) präsentierten dabei einen Großteil der Faserstrukturen, während AW aus G_c (**s. Abb. 6-11 A3**) nach wie vor viele Bereiche geschlossener Oberfläche aufwiesen. Die Fasern stellten sich auch hier in verschiedenen dicken Bündeln dar, wobei die Einzelfasern sich ebenso netzartig von den dickeren Bündeln ausbreiteten. Die Fasern in G₁ und G₂, die weniger von geschlossener Oberfläche umgeben waren, wirkten besonders fein und glatt.

Zusammenfassend führten flussabhängige Bewegung, Ultraschall, zyklische Inkubationsschemata und zunehmende Inkubationsdauern zu den deutlichsten Veränderungen der luminalen Oberflächentopographie. Folglich zeigten die 24 h zyklisch behandelten AW aus G_3 kaum mehr geschlossene Oberfläche und präsentierten die darunterliegende Faserstruktur im Gruppenvergleich am homogensten (**s. Abb. 6-11 E**). AW aus G_{c-24h} wiesen im Gegensatz zu G_3 auch nach 24 h DZ noch große Bereiche geschlossener Oberfläche auf (**s. Abb. 6-11 D**). Die Struktur der Faserbündel und Einzelfasern unterschied sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Gruppen. Vielmehr war lediglich das Ausmaß der sichtbaren Faserelemente verschieden stark ausgeprägt.

Die äußeren Oberflächen der AW aller fünf Gruppen bestanden vollständig aus sichtbaren Faserstrukturen. Dabei konnten sowohl dicke Faserbündel als auch schmale Einzelfasern im Nanometerbereich identifiziert werden. Während die dickeren Bündel oft einen gewellten Verlauf annahmen, waren die Einzelfasern als netzartige Ausläufer der größeren Strukturen erkennbar. Weder Inkubationsdauer und -schema noch die verschiedenen physikalischen Faktoren ließen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennen. Auch eine eindeutige Veränderung zu unbehandelten AW war hier nicht festzustellen (**s. Abb. 6-12**).

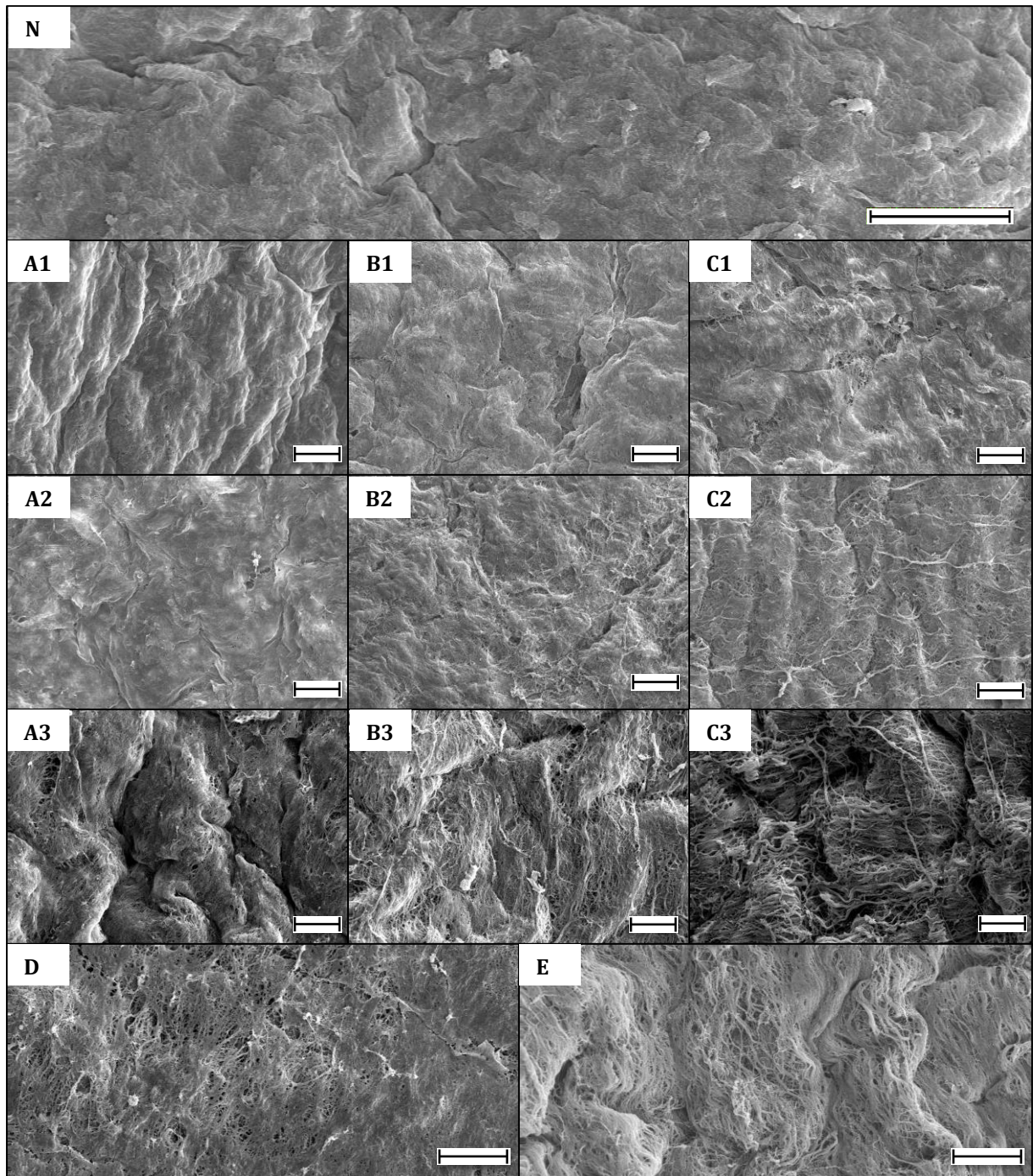


Abbildung 6-11: REM Analyse der luminalen Oberflächen: N = Nativprobe, A = G_c, B = G₁, C = G₂, D = G_{c-24h}, E = G₃; 1 = 4 h kontinuierliche DZ, 2 = 8 h kontinuierliche DZ, 3 = 8 h zyklische DZ.
 Die native AW (N) zeigte eine dichte, geschlossene Oberfläche. Behandelte AW zeigten DZ-Zeitabhängig zunehmend unterhalb der Oberfläche befindliche Faserstrukturen (A1-C1 → A2-C2). Hierbei zeigten AW aus G_c die geringsten Veränderungen zur Nativprobe (A1, A2). AW aus G₁ und G₂ unterschieden sich deutlicher von Nativproben. Bereits nach 4 h DZ waren hier Fasern sichtbar (B1, C1) und nach 8 h DZ (B2, C2) weitere Areale der Oberfläche nicht mehr geschlossen. Zyklische DZ Prozesse amplifizierten den Prozess der Freilegung der Fasern, sodass gruppenübergreifend nach 8 h zyklischer DZ am deutlichsten Faserstrukturen erkennbar waren (A3-C3). AW aus G₃ (E) zeigten nach 24 h zyklischer DZ kaum noch geschlossene Oberfläche und präsentierten ein feines Fasernetzwerk. AW aus G_{c-24h} (D) zeigten nach 24 h DZ noch große Bereiche geschlossener Oberfläche. In allen fünf Gruppen erschienen die Fasern der AW intakt. Maßstabsbalken: 20 µm.

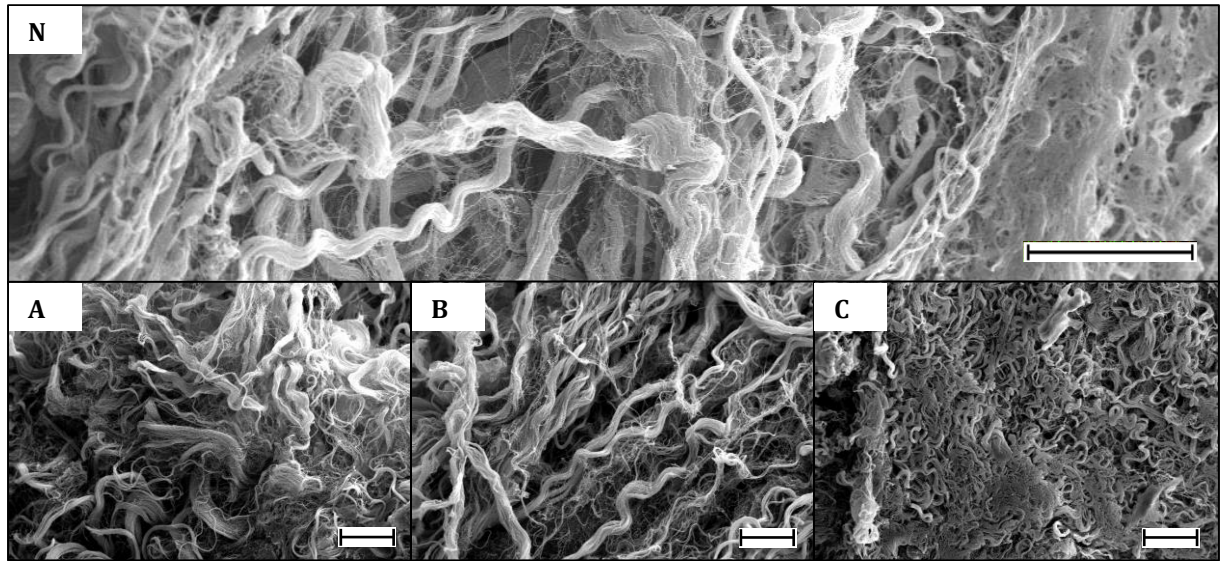


Abbildung 6-12: REM Analyse der äußeren Oberflächen: N = Nativprobe, A-C = 8 h zyklische DZ, A = G_c, B = G₁, C = G₂. Die native AW (N) zeigte intakt erscheinende Faserstrukturen. Dabei ließen sich größere und kleinere Bündel von Fasern erkennen. 8 h zyklisch dezellularisierte AW aus G_c (A), G₁ (B) und G₂ (C) zeigten ein der nativen AW vergleichbares Bild. Auch hier waren verschieden dicke Zusammenlagerungen aus Faserstrukturen erkennbar. Maßstabsbalken 20 µm.

7 DISKUSSION

Moderne DZ Protokolle bedienen sich in der Regel einer Kombination mehrerer DZ Methoden. Aufgrund der Vielfalt an möglichen Kombinationen sind die resultierenden Protokolle nur selten vergleichbar. Folglich konnten bisher die Effekte der einzelnen Methoden sowie deren Potential zur Optimierung von DZ Prozessen nur schwer beurteilt werden. Aus diesem Grund analysierten wir im Rahmen der Dissertation DZ Faktoren systematisch und unabhängig voneinander. Hierzu untersuchten wir ausgewählte physikalische und prozedurale DZ Methoden.

Anwendungstechniken der DZ Lösung

Sowohl physikalische als auch prozedurale DZ Methoden gelten als entscheidende Bestandteile erfolgreicher DZ Protokolle. Eine der am weitesten verbreiteten physikalischen Methoden ist das kontinuierliche Schütteln der Gewebeprobe in DZ Lösung. Diese Technik wurde im Rahmen der Studie als Kontrollgruppe gewählt. [16] Aufgrund der Limitationen schüttelbasierter Protokolle in der DZ komplexer Gewebe, wurden in der jüngeren Vergangenheit neue Anwendungstechniken der DZ Lösung erprobt. Dabei erwiesen sich perfusionsbasierte Techniken effektiv in der DZ komplexer, vormals nur schwer dezellularisierbarer Organstrukturen. [73, 90, 151] Petersen et al. zeigten hierzu, dass Rattenlungen durch Perfusion der Gefäß- und Atemwege innerhalb weniger Stunden vollständig dezellularisierbar waren. [151] Gilpin et al. dezellularisierten mithilfe desselben Prinzips die Lungen von Schweinen und Menschen ebenso erfolgreich. [152] Abgesehen von Lungen, wurden auch Herzen und Nieren durch Perfusion ihrer Gefäßstrukturen erfolgreich dezellularisiert. [153] Hodgson et al. stellten innerhalb von 24 h vollständig dezellularisierte Herzen von Schweinen her. [108] Im Gegensatz dazu musste Myokardgewebe vor Einführung perfusionsbasierter DZ Protokolle für mehrere Tage in DZ Lösung geschüttelt werden, um vollständig azellulär zu sein. [109] Die Fähigkeit zur DZ ganzer Organe bei gleichzeitiger Verkürzung der DZ Zeiten verdeutlicht das Potential perfusionsbasierter DZ Protokolle. Dabei war das Konzept der Perfusion jedoch lediglich Geweben mit ausreichender Gefäßstruktur vorenthalten. [16] Für die Vielzahl an Geweben, die diese Voraussetzung nicht erfüllten, sollten ebenso effektivere Anwendungstechniken der DZ Lösung entwickelt werden. In diesem Zusammenhang

stellten die AW ein adäquates Versuchsmaterial dar. Diese zeichneten sich nicht nur durch das Fehlen einer ausreichenden Gefäßstruktur aus, sondern erwiesen sich darüber hinaus in der Vergangenheit aufgrund ihrer dichten Gewebestruktur als schwer zu dezellularisieren. [85, 134] Mithilfe einer neuen – verglichen mit kontinuierlichem Schütteln – intensiveren Anwendungsart der DZ Lösung, sollten nun Gewebe wie die AW effektiver behandelt werden können. [16] Hierzu erfolgte im Rahmen der Dissertation eine alternative Umsetzung des Prinzips der flussabhängigen DZ. Dabei wurden die Versuchsproben durch einen pumpenbetriebenen Volumenstrom mit hoher Intensität bewegt. Bereits nach 4 h kontinuierlicher DZ waren die Vorteile dieser neuen Technik zu erkennen. So wurden im Vergleich zur konventionellen Schüttelmethode Zugewinne an EDT von bis zu 19 % ($p < 0,05$) erreicht. Auch bei zyklischer Inkubation (15 %, $p < 0,05$) und nach 8 h DZ (14 %, $p < 0,05$) zeigte sich die neu entwickelte Methodik dem konventionellen Schütteln signifikant überlegen.

Ultraschall zur Maximierung der DZ Effektivität

Abgesehen von intensiveren Anwendungstechniken der DZ Lösungen wurde additive Ultraschallbehandlung als eine weitere Möglichkeit zur Maximierung der DZ Effektivität untersucht. Vormalig bezeichneten Hung et al. Ultraschall als eine vielversprechende Methode in der DZ von Kehlköpfen. [154] Oliveira et al. dezellularisierten Dünndarmstücke effektiv durch Ultraschallbehandlung. [111] Azhim et al. zeigten sich darüber hinaus in der Lage mithilfe von Ultraschallbehandlung chemisch basierte DZ Protokolle zu verkürzen. [97] Die Auswertung der ultraschallbehandelten AW aus G₂ bestätigte die bisherigen Untersuchungen zur Effektivität des Ultraschalls. So zeigte der Vergleich aus G₂ und G₁ nach 4 h DZ, dass der zusätzliche Einsatz von Ultraschall zu signifikanten Anstiegen der EDT_a (25 %, $p < 0,001$) geführt hatte. Auch bei längeren und zyklischen Inkubationsprotokollen (8 h zyklisch) unterschieden sich die EDT_a der beiden Gruppen signifikant voneinander (22 %, $p < 0,01$). An den inneren Oberflächen führte die additive Ultraschallexposition ebenfalls zu Anstiegen der EDT_i (Maximum: 36 %, $p < 0,01$). Somit konnten vormalige vielversprechende Ergebnisse zum Einsatz von Ultraschallwellen bestätigt werden. [97, 155] Dabei könnten die höheren EDT der Ultraschall-Kavitation sowie der durch die Vibrationseffekte erleichterten Diffusion der Detergentien zugeschrieben werden. [97, 156]

Erhalt der Extrazellulärmatrix

Trotz der Vorteile der zusätzlichen Ultraschallbehandlung ist zu berücksichtigen, dass gerade die Kavitationseffekte bei exzessivem Einsatz von Ultraschall zu Schäden am Faserapparat der EZM führen können. [154, 156] Oliveira et al. beschrieben in diesem Kontext, dass gewisse Komponenten der EZM sensitiver für die Auswirkungen des Ultraschalls sein könnten. Das Risiko für Schäden an diesen Strukturen bestehe dabei insbesondere bei lang andauerndem Einsatz von Ultraschall. [111] In der Folge könnte der Erhalt der EZM Struktur mit ihrer Notwendigkeit für Zellkommunikation und Gewebestabilität, verfehlt werden. [106] Mögliche Konsequenzen hiervon wären unter anderem reduzierte mechanische Belastbarkeit, limitierte Haltbarkeit sowie verminderte Fähigkeit zur Rezellularisierung. [60, 85, 104] Zum Ausschluss von derart bedingten Schäden und damit einhergehenden Veränderungen der Gewebeeigenschaften, wurde intensiv nach Veränderungen der EZM gesucht. Hierbei erlaubte die MPC Färbung eine umfassende Beurteilung der Struktur der AW. Vergleichbar zu den nativen AW zeigten die behandelten Proben aller fünf Gruppen die verschiedenen Schichten der AW. Dabei waren die glatte innere Oberfläche der Tunica Intima, die in Grundsubstanz eingebetteten elastischen und kollagenen Fasern der Tunica Media sowie die kräftigen Kollagenbündel der Tunica Adventitia erkennbar. Zur detaillierteren Beurteilung der Kollagenstruktur wurden die Proben mithilfe der PSR Färbung beurteilt. Dabei erschien die Kollagenverteilung und -struktur in allen Gruppen sowohl in der licht- als auch in der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung unverändert. Es fiel jedoch auf, dass sowohl in MPC als auch in PSR gefärbten Schnitten die äußeren Schichten der behandelten AW aufgelockert (MPC) beziehungsweise aufgehellt (PSR) wirkten. In MPC gefärbten Schnitten ließ sich erkennen, dass das Ausmaß dieser Auflockerung mit den dezellularisierten, kernfreien Arealen übereinstimmte. Auch im Vergleich der MPC und PSR mit den DAPI und H&E Schnitten ließ sich diese Beobachtung untermauern. Folglich müsste die Auflockerung in MPC beziehungsweise Aufhellung in PSR das Korrelat der Entfernung der zellulären Komponenten gewesen sein. Dahl et. al hatten vormals hierzu beschrieben, dass die EZM Struktur von Arterien nach der Entfernung der zellulären Substanzen deutlich weniger dicht erscheine. [157] Die an der Außenseite beschriebenen, in ihrer Struktur angegriffenen Fasern waren hingegen nicht als Folge des DZ Prozesses, sondern vielmehr als Konsequenz der eingehenden Präparation anzusehen. So zeigten auch Nativproben vergleichbare Faserstrukturen an deren äußeren Oberflächen. [157] Die

Präparation mit Entfernung der Fett- und Bindegewebsanhängsel hatte die anschließenden Prozesse der Zellentfernung erleichtern und gleiche Ausgangsbedingungen für alle Proben schaffen sollen. [95] Neben MPC und PSR wurde auch die REM zur Beurteilung der Struktur der EZM verwendet. Diese zeigte, dass die AW aller fünf Gruppen Teile ihrer Faserstruktur präsentierten. Hierbei waren die Fasern in den ultraschallbehandelten AW mit den höchsten EDT am deutlichsten erkennbar. Abgesehen hiervon waren keine weiteren Veränderungen zum Nativzustand ersichtlich. Insbesondere die Struktur der Fasern hatte durch die verschiedenen DZ Methoden keinen Schaden genommen.

Zusammenfassend konnten in keiner der fünf Gruppen mikroskopisch sichtbare Schäden an der Struktur der AW entdeckt werden. Dennoch sollte insbesondere der Einsatz von Ultraschallwellen limitiert erfolgen, um die Gewebeeigenschaften nicht nachteilig zu beeinflussen. [154] Zusätzlich könnten künftige Studien quantitativ-mechanische Tests inkludieren, da die Entfernung der zellulären Substanzen Auswirkungen auf die Gewebestabilität haben könnte. [158] Fitzpatrick et al. hatten in diesem Zusammenhang mithilfe uniaxialer Belastungstests Aussagen über die mechanischen Eigenschaften von dezellularisierten AW treffen können. [85] Zou et al. verwendeten hierzu, anstatt von uniaxialen, biaxiale Belastungstests. Diese sollten die physiologisch auf die AW einwirkenden Kräfte exakter imitieren und dadurch die Aussagekraft der Ergebnisse erhöhen. [110] Studien zur DZ von Geweben des Bewegungsapparates bedienten sich ebenso bereits quantitativ-mechanischer Tests zur Charakterisierung der behandelten Gewebe. [67, 159]

Intermittierende Waschschriffe zur Erhöhung der DZ Effektivität

Nach der Auswertung der Einflüsse physikalischer Methoden wurden als nächstes die Effekte der intermittierenden Waschschriffe untersucht. Terminale Waschschriffe zur Vermeidung toxischer Effekte residualer DZ Agentien sind bereits Bestandteil der meisten DZ Protokolle. [60, 160-162] Darüber hinaus inkludiert eine steigende Anzahl erfolgreicher Protokolle auch intermittierende Waschschriffe. Perea-Gil et al. vervollständigten beispielsweise zwei Phasen Detergens-Exposition durch eine dazwischen liegende intensive Waschperiode und dezellularisierten damit erfolgreich Myokard. [104] Pellegata et al. beschrieben ein Protokoll mit mehreren intermittierenden Waschschriffen zur effektiven DZ von arteriellen Gefäßen. [163] Der Zweck der intermittierenden Waschphasen ist die Entfernung der DZ Agentien sowie

des zellulären Detritus. Dadurch sollen die DZ Agentien tiefer ins Gewebe eindringen können. Bestätigt wurden diese Überlegungen durch deutliche Anstiege der EDT sowohl an äußerer (Maximum: 43 %, $p < 0,001$) als auch innerer (Maximum: 48 %, $p < 0,01$) Oberfläche. Damit konnte gezeigt werden, dass zyklische Inkubationsschemata zu signifikant besseren DZ Ergebnissen führten als kontinuierliche Inkubationsschemata. In der REM Auswertung äußerten sich die Effekte der intermittierenden Waschschriffe durch eine deutlicher freigelegte Faserstruktur. Darüber hinaus waren keine weiteren Unterschiede zwischen zyklisch und kontinuierlich behandelten AW ersichtlich. Insbesondere die Struktur der Fasern erschien unabhängig vom Inkubationsschema intakt. Die Ergebnisse der REM unterstützten somit die These, dass zyklische Inkubationsschemata zur verstärkten Extraktion von Zelldetritus führen und somit zu effektiveren DZ Prozessen beitragen. Um zusätzlich die Entfernung der DZ Agentien durch die Waschschriffe zu beurteilen, könnten künftig deren residuale Mengen mithilfe von quantitativen Tests bestimmt werden. Mathapati et al. beschrieben hierzu eine erfolgreiche Methode zur Messung residualer Mengen an SD. Dabei bestimmten sie die optische Dichte der verbliebenen SD Moleküle und zogen hieraus Rückschlüsse auf deren Konzentration. [164] Mithilfe von Messungen dieser Art soll sichergestellt werden, dass die DZ Agentien keine negativen Effekte auf die Eigenschaften der dezellularisierten Gewebe haben. Rieder et al. beschrieben in diesem Zusammenhang, dass hohe residuale Mengen an SDS die Rezellularisierung der Gewebe erschweren oder gar behindern können. [87] Cebotari et al. zeigten dabei aber auch, dass ausgiebiges Waschen die Konzentrationen der Agentien unter eine toxische Grenze senken und somit die erfolgreiche Besiedlung mit Zellen ermöglichen konnte. [160] Die Messung der residualen Mengen an DZ Agentien könnte somit künftig als Methode zur Beurteilung der Rezellularisierbarkeit der Gewebe verwendet werden.

Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf das DZ Ergebnis

Abgesehen von den eingesetzten DZ Techniken existieren weitere Variablen, welche die EZM und damit die Gewebeeigenschaften verändern können. Stark variierende Temperaturen zeigten sich beispielsweise in der Lage, die Struktur der behandelten Gewebe zu beeinflussen. [165, 166] Negishi et al. beschrieben hierzu, dass die Anzahl an Kollagenfasern in dezellularisierten Arterien durch die Temperatur der Waschprozesse beeinflusst werden konnte. Dabei führte eine abschließende Waschttemperatur von 37 °C, verglichen mit 4 °C, zu einem verringerten Kollagengehalt und in der Folge zu

schlechteren in vivo Resultaten. [167] Zur Vermeidung derartiger Effekte wurde in allen Gruppen eine konstante DZ Temperatur von 37 °C sichergestellt und die abschließende Waschphase bei Raumtemperatur absolviert.

Neben schwankenden Temperaturen können auch Veränderungen des pH-Wertes Einfluss auf die DZ Ergebnisse nehmen. Tsuchiya et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass stark variierende pH-Werte der DZ Lösung die Entfernung der DNA sowie den Erhalt der EZM und die Fähigkeit zur Rezellularisierung beeinflussen können. [168] Um mögliche Auswirkungen des pH-Wertes auf die DZ Ergebnisse zu erfassen, wurden in G_c, G₁ und G₂ dessen prozedurale Änderungen gemessen. Die Auswertung zeigte, dass die Abfälle der pH-Werte in den zyklischen Inkubationsschemata aufgrund des zweistündlichen Lösungswechsels geringer ausgeprägt waren. Da die Veränderungen bei den kontinuierlichen Schemata ebenfalls nicht als stark variierend (Maximum: 2,5 %) galten, ließen sich Einflüsse des pH-Wertes auf die Proteinstrukturen ausschließen. [135-138] Um zusätzlich den Einfluss des pH-Wertes auf die DZ Effektivität zu beurteilen, könnten künftig DZ Lösungen mit verschiedenen pH-Werten verwendet werden. Tsuchiya et al. beschrieben hierzu, dass bei der von ihnen verwendeten DZ Lösung niedrigere pH-Werte besser geeignet waren, die EZM Strukturen zu bewahren. Gleichzeitig hätten jedoch höhere pH-Werte die zellulären Bestandteile effektiver entfernt. [168] Basierend auf diesen Aussagen sollte für jede DZ Lösung ein pH-Optimum verwendet werden, welches sowohl die effektive Entfernung der Zellen als auch den vollständigen Erhalt der EZM ermöglicht.

Einfluss der DZ Zeit

Abgesehen von den Effekten intermittierender Waschphasen untersuchten wir auch den Einfluss der Inkubationsdauer auf die resultierenden EDT. Der Vergleich der EDT_a nach 4 h und 8 h zeigte, dass sich die EDT in allen drei Gruppen (G_c, G₁, G₂) ca. verdoppelt hatten. Dieser Eindruck einer beinahe linearen Zeitabhängigkeit der EDT wurde durch die Ergebnisse der 24 h behandelten Proben aus G₃ widerlegt. Trotz Verbesserung der eingesetzten Methoden (G₂ → G₃) und Verdreifachung der Inkubationszeit (8 h → 24 h), konnten die EDT sowohl an der inneren als auch an der äußeren Oberfläche nicht einmal verdoppelt werden. Aufgrund der Unterschiede der eingesetzten DZ Methoden aus G₂ und G₃ konnten auf Basis dieser Ergebnisse keine finalen Schlussfolgerungen gezogen werden. Nichtsdestotrotz legten die Beobachtungen nahe, dass die Inkubationszeit nicht der einzige Faktor war, der Einfluss auf die EDT hatte. Die DZ

Effektivität schien vielmehr von multiplen Faktoren abhängig zu sein. [16] Dazu zählten in unserer Studie die Inkubationsdauer, die Agentien-Diffusion (unter anderem erhöht durch Ultraschallbehandlung und zyklische Inkubationen) und die Gewebebeschaffenheit (s. Unterschiede EDT_a und EDT_i). Aufgrund der Vielzahl an Einflussfaktoren, sollten lange Behandlungszeiten für sich alleine nicht automatisch in erfolgreichen DZ Ergebnissen resultieren. Helder et al. berichteten hierzu beispielsweise, dass Herzklappen von Schweinen trotz DZ für 4 Tagen in SDS nicht vollständig frei von antigenen Strukturen waren. [169] Auch im Rahmen unserer Studie zeigten sich die begrenzten Möglichkeiten langer Inkubationszeiten. Dies spiegelte sich im verhältnismäßig geringen Zugewinn an EDT und der großen Zahl an verbliebenen Kernen nach 24 h DZ wider. Die Ergebnisse widersprachen damit vormals veröffentlichten Arbeiten zur erfolgreichen DZ humaner AW innerhalb von 24 h und bestätigten vielmehr die ebenso beschriebenen Schwierigkeiten in der DZ von AW. [78, 87, 134]

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass zyklische und längere Inkubationsschemata zu effektiveren DZ Prozessen geführt hatten. Auf eine Quantifizierung der Ergebnisse mithilfe von Messungen der verbleibenden DNA Mengen wurde in dieser Studie verzichtet. Ausschlaggebend hierfür waren die verschiedenen Dicken der AW sowie die noch großen Mengen an residualem Kernmaterial. Dies hätte dazu geführt, dass die AW trotz gleicher EDT, je nach individueller Dicke, verschieden hohe Mengen an residuärer DNA aufgewiesen hätten. Dadurch wäre eine vergleichende Beurteilung der einzelnen Gruppen nur schwer möglich gewesen. Dennoch sollte in künftigen Studien versucht werden, DNA Quantifizierungstests anzuwenden. [64] Dazu könnte beispielsweise die Dicke verwendeten Gewebestücke einheitlich festgelegt werden. Insbesondere wenn die Gewebe mikroskopisch kernfrei erscheinen, wäre dann mithilfe von DNA Quantifizierungen eine differenziertere Beurteilung des DZ Ergebnisses möglich. [153]

Modifiziertes DZ Protokoll

Die Ergebnisse der physikalischen und prozeduralen Einflussfaktoren berücksichtigend, wurde im Rahmen der Dissertation ein modifiziertes DZ Protokoll entwickelt. Dieses basierte auf der Kombination aus Flussbewegung, Ultraschalleinsatz und zyklischem Inkubationsschema. Die Modifikationen beinhalteten eine leistungsfähigere Pumpe, verlängerte Inkubationsdauern sowie einen adaptierten Einsatz von Waschzyklen und

Ultraschall. Das resultierende Protokoll aus G₃ führte, verglichen mit den 8 h zyklisch behandelten AW aus G₂, zu einem signifikanten Zugewinn an EDT_a von 39 % (p<0,001) und EDT_i von 46 % (p<0,001). Auch im Vergleich mit der 24 h kontinuierlich behandelten Schüttel-Gruppe (G_{c-24h}) zeigte sich das Protokoll aus G₃ überlegen. Hierbei wiesen die AW aus G₃ ebenfalls signifikant höhere EDT sowohl an der äußeren (30 %, p<0,001) als auch inneren (23 %, p<0,001) Oberfläche auf. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse der eingesetzten Kombination an DZ Methoden, ließen sich im Rahmen der Literaturrecherche keine Protokolle finden, die alle dieser Faktoren berücksichtigten. [16, 17, 45, 72, 87, 97] In Anbetracht dessen könnten DZ Dauer, Erhalt der EZM und Entfernung der zellulären Substanzen in einer Vielzahl der gängigen DZ Protokolle optimiert werden.

Trotz höherer EDT verdeutlichte die Auswertung aus G₃ auch ein Problem aktueller DZ Prozeduren. Während dünne Gewebe einfach dezellularisiert werden können, gelten dickere und dichte Gewebe als deutlich schwieriger zu behandeln. [45, 64, 103, 134, 170] Im Rahmen unserer Studie zeigten dabei selbst die für 24 h behandelten AW aus G₃ immer noch viele Kerne in den zentralen Schichten. Als entscheidend für die variierenden Schwierigkeitsgrade vollständiger DZ gelten Besonderheiten der Gewebestruktur. In unseren Versuchen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die äußeren Schichten der AW leichter dezellularisiert wurden als die inneren (EDT_a > EDT_i). Eine mögliche Erklärung für die niedrigeren EDT_i bot die Struktur der Lamina elastica interna. Diese ist als Diffusionsbarriere beschrieben und könnte daher die Ausbreitung der DZ Agentien vermindert haben. [171] Eine ähnliche, selektiv verminderte, Durchlässigkeit erfuhren Wilson et al. in der DZ von Hornhäuten. Gemäß deren Schilderungen würden Gewebe mit hoher Dichte die vollständige Entfernung zellulären Materials gar vielleicht generell verhindern ohne gleichzeitig die EZM zu schädigen. [170] Somit stellte sich die Frage, wie die beiden Anforderungen der vollständigen Entfernung zellulären Materials und des Erhalts intakter Matrixstrukturen für dichte Gewebe kombiniert werden können. Mithilfe aktuell gängiger DZ Protokolle erscheint das Erfüllen beider Ziele nur schwer erreichbar. Infolgedessen weisen dezellularisierte Gewebestücke entweder verbleibendes zelluläres Material oder aber nachteilig veränderte strukturelle Eigenschaften auf. Beide Umstände könnten den erfolgreichen Einsatz dezellularisierter Gewebe verhindern. [45] Nicht vollständig entfernte Zellelemente können beispielsweise inflammatorische Reaktionen und in der Folge ungünstige kurz- oder langfristige Ereignisse im klinischen Einsatz bedingen. [50,

62, 63, 79] Schäden an der EZM können die biologischen und mechanischen Gewebeeigenschaften beeinflussen und dadurch die Rezellularisierungskapazität und Haltbarkeit der Gewebe verändern. [87, 106] Um in Zukunft auch dickere Gewebe erfolgreich zu dezellularisieren und damit deren klinischen Einsatz zu ermöglichen, erscheint es also nötig, DZ Protokolle gezielt zu verbessern. Dies erfolgte im Rahmen der Dissertation durch die systematische Beurteilung von physikalischen und prozeduralen DZ Methoden. Die Erfolge des darauf basierenden Protokolls aus G₃ zeigten, dass dadurch Gewebe effektiver behandelt und damit deren klinischer Verwendung ein Stück weit näher gebracht werden können.

8 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Studie untersuchten wir ausgewählte physikalische und prozedurale DZ Methoden systematisch und unabhängig voneinander. Die Effekte der DZ Methoden wurden hierbei selektiv beurteilt und anschließend zur Optimierung von DZ Prozessen verwendet.

Untersucht wurden verschiedene Bewegungsformen der Gewebeproben, der Einsatz von Ultraschallwellen sowie die Effekte von Inkubationszeit und Inkubationsschema. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass sowohl die physikalischen als auch die prozeduralen DZ Techniken einen signifikanten Einfluss auf die DZ Effektivität hatten. Dabei wurden, verglichen mit kontinuierlichem Schütteln, mithilfe einer flussabhängigen Bewegungsform signifikante Zugewinne an DZ Effektivität erzielt. Ebenso führte die additive Verwendung von Ultraschallwellen zur effektiveren Entfernung der zellulären Elemente. Zusätzlich zur Beurteilung der Zellentfernung untersuchten wir, ob die eingesetzten DZ Methoden Auswirkungen auf die Struktur der EZM hatten. Hierbei konnte die Unschädlichkeit der verwendeten DZ Methoden anhand von licht-, fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopischer Beurteilung der EZM bestätigt werden. Der Vergleich von kontinuierlichen und zyklischen Inkubationsschemata zeigte, dass intermittierende Waschschriffe eine weitere Möglichkeit zur Optimierung von DZ Prozessen darstellten. Die Waschphasen verbesserten die Diffusion der DZ Agentien und ermöglichten damit die effektivere Entfernung der zellulären Komponenten. Abschließend belegten wir, dass auch die DZ Dauer entscheidenden Einfluss auf das DZ Ergebnis hatte. Es zeigte sich jedoch, dass die Verlängerung der DZ Zeit alleine nicht automatisch zu einer erfolgreichen DZ führte.

Zusammenfassend ermöglichten eine flussabhängige Bewegungsform, der Einsatz von Ultraschall sowie zyklische und längere Inkubationsschemata effektivere DZ Prozesse. Insbesondere die Kombination dieser vier Faktoren führte, im Vergleich zu kontinuierlicher Kurzzeit-Inkubation und Schüttelbewegung, zu einer signifikant höheren DZ Effektivität. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse wurde ein optimiertes DZ Protokoll erstellt. Dieses resultierte in der effektivsten Entfernung der zellulären Elemente und bestätigte damit die vorherigen Resultate.

Die Ergebnisse dieser Studie belegten, dass die systematische Evaluation einzelner DZ Methoden zur Optimierung von DZ Prozessen beitragen kann. Basierend auf diesen

Erkenntnissen sollten die Effekte weiterer DZ Methoden ebenfalls systematisch untersucht und zur Erhöhung der Effektivität von DZ Prozessen verwendet werden. Dabei könnte für künftige Untersuchungen der Einsatz weitergehender Analysemethoden eruiert werden. Insbesondere mechanische Belastungstests und DNA Quantifizierungen erscheinen hierbei als sinnvolle zusätzliche Auswertemethoden. Letzten Endes sollten die DZ Methoden möglichst umfassend untersucht werden, um so deren optimale Verwendung zu ermöglichen. Langfristig erscheinen so die effektive DZ von bisher schwer zu behandelnden Geweben und damit deren klinischer Einsatz als biologische Implantate realisierbar.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ellis, H., *A history of surgery*. 2001, London: Greenwich Medical Media Limited.
2. Von Brunn, W., *Kurze Geschichte der Chirurgie*. 1928, Berlin: Verlag von Julius Springer.
3. Ritt, M.J., et al., *The early history of arthroplasty of the wrist. From amputation to total wrist implant*. J Hand Surg Br, 1994. 19(6): p. 778-82.
4. Schibilsky, M. *Geschichte der Implantate und Prothesen*. 2013 [cited 2016 11-24]; Available from: <https://www.bvmed.de/de/technologien/geschichte/geschichte-implantate>.
5. Mettelsiefen, J.K., S.; Lützner, J.; Günther, K.-P., *Entwicklung der Knieendoprothetik, Indikation und sozioökonomische Gesichtspunkte*. AE-Manual der Endoprothetik, 2010: p. 47-55.
6. Stone, W., Jr., *Alloplasty in surgery of the eye*. N Engl J Med, 1958. 258(12): p. 596-602 concl.
7. Cosson, M., et al., *Mechanical properties of synthetic implants used in the repair of prolapse and urinary incontinence in women: which is the ideal material?* Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2003. 14(3): p. 169-78; discussion 178.
8. Klee, U., Mistry, H., Brar, R., Valenti, D., *Innovationen von Dialyseshuntprothesen*. Gefäßchirurgie, 2012. 17(2): p. 106-114.
9. Schlich, T., *Die Erfindung der Organtransplantation. Erfolg und Scheitern des chirurgischen Organersatzes (1880-1930)*. 1998, Frankfurt/ Main; New York: Campus Verlag Frankfurt/ New York.

10. Rohrbach, M.J., Trost, F., *Die Geschichte der Keratoplastik*. Zeitschrift für praktische Augenheilkunde, 2004. 25: p. 469-477.
11. Müller-Ruchholtz, W., *Grundlagen der Transplantationsimmunologie*. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1971. 96.08: p. 347-353.
12. Merrill, J.P., et al., *Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins*. J Am Med Assoc, 1956. 160(4): p. 277-82.
13. Binet, J.P., *Pioneering in heterografts*. Ann Thorac Surg, 1989. 48(3 Suppl): p. S71-2.
14. Burns, P., et al., *Performance of a new vascular xeno prosthesis*. ASAIO Trans, 1989. 35(3): p. 214-8.
15. Neufang, A., Schmiedt, W., Kopp, H., Dorweiler, B., Reinstadler, J., Oelert, H., *Der kniegelenküberschreitende femoropopliteale Bypass mit der glutaraldehydfixierten denaturierten menschlichen Nabelschnurvene (Dardik-Biograft) – Erfahrungen mit der modifizierten Prothese*. Gefässchirurgie, 2000. 5(2): p. 91-98.
16. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. 32(12): p. 3233-43.
17. Keane, T.J., I.T. Swinehart, and S.F. Badylak, *Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance*. Methods, 2015. 84: p. 25-34.
18. Wengler, A., U. Nimptsch, and T. Mansky, *Hip and knee replacement in Germany and the USA: analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011*. Dtsch Arztebl Int, 2014. 111(23-24): p. 407-16.
19. Egermann, M., Thomsen, M., *Myoelektrische Prothesen bei Kindern im Kindergartenalter*. Der Orthopäde, 2003. 32(2): p. 164-169.

20. Iqbal, J., J. Gunn, and P.W. Serruys, *Coronary stents: historical development, current status and future directions*. Br Med Bull, 2013. 106: p. 193-211.
21. Gott, V.L., D.E. Alejo, and D.E. Cameron, *Mechanical heart valves: 50 years of evolution*. Ann Thorac Surg, 2003. 76(6): p. S2230-9.
22. Johnson, M., *Breast implants: history, safety, and imaging*. Radiol Technol, 2013. 84(5): p. 439M-515M; quiz 516M-520M.
23. Verzini, F., et al., *Fourteen-year outcomes of abdominal aortic endovascular repair with the Zenith stent graft*. J Vasc Surg, 2016.
24. Tande, A.J. and R. Patel, *Prosthetic joint infection*. Clin Microbiol Rev, 2014. 27(2): p. 302-45.
25. Walter, G., Hoffmann, R., *Implant-associated infections in orthopedic and trauma surgery*. Krankenhaus-Hygiene + Infektionsverhütung, 2009. 31(1): p. 8-14.
26. Prantl, L., et al., *[Histological and immunohistochemical investigations with capsular contracture after breast augmentation with smooth silicone gel implants]*. Handchir Mikrochir Plast Chir, 2006. 38(4): p. 224-32.
27. Eikelboom, J.W., et al., *Dabigatran versus warfarin in patients with mechanical heart valves*. N Engl J Med, 2013. 369(13): p. 1206-14.
28. Scharfschwerdt, M., et al., *Prosthetic replacement of the ascending aorta increases wall tension in the residual aorta*. Ann Thorac Surg, 2007. 83(3): p. 954-7.
29. Kokubo, T., H.M. Kim, and M. Kawashita, *Novel bioactive materials with different mechanical properties*. Biomaterials, 2003. 24(13): p. 2161-75.
30. Bachmann, B., Avgitidou, G., Siebelmann, S., Cursiefen, C., *Hornhautchirurgie und Hornhauttransplantation bei Kindern*. Der Ophthalmologe 2015. 112(2): p. 110-117.

31. Pichlmayr, R., *Present status of transplantation of kidney, liver and intestine: Aspects of biological and artificial organ supply*. Langenbeck's Archives of Surgery, 1987. 372(1): p. 321-326.
32. DSO, *Jahresbericht 2016 Organspende und Transplantation in Deutschland*. 2016: Frankfurt am Main.
33. Cuminetti, G., et al., *Contemporary use of arterial and venous conduits in coronary artery bypass grafting: anatomical, functional and clinical aspects*. Neth Heart J, 2016.
34. Ziza, V., et al., *Outcomes of cold-stored venous allograft for below-knee bypasses in patients with critical limb ischemia*. J Vasc Surg, 2015. 62(4): p. 974-83.
35. Manji, R.A., W. Lee, and D.K. Cooper, *Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future*. Int J Surg, 2015. 23(Pt B): p. 280-4.
36. Khoo, J.P., et al., *Differences in performance of five types of aortic valve prostheses: haemodynamic assessment by dobutamine stress echocardiography*. Heart, 2013. 99(1): p. 41-7.
37. Huygens, S.A., et al., *Contemporary outcomes after surgical aortic valve replacement with bioprostheses and allografts: a systematic review and meta-analysis*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016.
38. Carpenter, J.P. and J.E. Tomaszewski, *Human saphenous vein allograft bypass grafts: immune response*. J Vasc Surg, 1998. 27(3): p. 492-9.
39. Ciesek, S., M. Manns, and C. Strassburg, *[Sequelae of organ transplantation]*. Internist (Berl), 2006. 47(3): p. 252, 254-6, 258-60 passim.
40. Baba, H.A., Sotiropoulos, G. C., *Transplantationspathologie: Quo vadis?* Der Pathologe, 2011. 32(2): p. 93-94.

41. Suri, R.M. and H.V. Schaff, *Selection of aortic valve prostheses: contemporary reappraisal of mechanical versus biologic valve substitutes*. *Circulation*, 2013. 128(12): p. 1372-80.
42. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. Vol. 3. 2009. p.95.
43. Badylak, S.F., D.O. Freytes, and T.W. Gilbert, *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. *Acta Biomater*, 2009. 5(1): p. 1-13.
44. Badylak, S.F., D. Taylor, and K. Uygun, *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2011. 13: p. 27-53.
45. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. *Biomaterials*, 2006. 27(19): p. 3675-83.
46. Ketchedjian, A., et al., *Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions*. *Ann Thorac Surg*, 2005. 79(3): p. 888-96; discussion 896.
47. Welman, T., et al., *Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges*. *Bioengineered*, 2015. 6(5): p. 257-61.
48. Choi, Y.C., et al., *Decellularized extracellular matrix derived from porcine adipose tissue as a xenogeneic biomaterial for tissue engineering*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012. 18(11): p. 866-76.
49. Vacanti, C.A., *The history of tissue engineering*. *J Cell Mol Med*, 2006. 10(3): p. 569-76.
50. Keane, T.J., et al., *Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response*. *Biomaterials*, 2012. 33(6): p. 1771-81.

51. Exposito, J.Y., et al., *Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro-alpha 2(I) collagen*. J Biol Chem, 1992. 267(22): p. 15559-62.
52. Manji, R.A., et al., *Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection*. Circulation, 2006. 114(4): p. 318-27.
53. Khatri, P., et al., *A common rejection module (CRM) for acute rejection across multiple organs identifies novel therapeutics for organ transplantation*. J Exp Med, 2013. 210(11): p. 2205-21.
54. Vorotnikova, E., et al., *Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo*. Matrix Biol, 2010. 29(8): p. 690-700.
55. Barkan, D., J.E. Green, and A.F. Chambers, *Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth*. Eur J Cancer, 2010. 46(7): p. 1181-8.
56. Nelson, C.M. and M.J. Bissell, *Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. 22: p. 287-309.
57. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. 69(3): p. 562-73.
58. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiol Rev, 2003. 83(3): p. 835-70.
59. Bornstein, P. and E.H. Sage, *Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function*. Curr Opin Cell Biol, 2002. 14(5): p. 608-16.
60. Williams, C., et al., *Altered structural and mechanical properties in decellularized rabbit carotid arteries*. Acta Biomater, 2009. 5(4): p. 993-1005.

61. Bader, A., et al., *Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix*. *Transplantation*, 2000. 70(1): p. 7-14.
62. Nagata, S., R. Hanayama, and K. Kawane, *Autoimmunity and the clearance of dead cells*. *Cell*, 2010. 140(5): p. 619-30.
63. Brown, B.N., et al., *Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component*. *Biomaterials*, 2009. 30(8): p. 1482-91.
64. Gilbert, T.W., J.M. Freund, and S.F. Badylak, *Quantification of DNA in biologic scaffold materials*. *J Surg Res*, 2009. 152(1): p. 135-9.
65. Zheng, M.H., et al., *Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005. 73(1): p. 61-7.
66. Hoganson, D.M., et al., *The retention of extracellular matrix proteins and angiogenic and mitogenic cytokines in a decellularized porcine dermis*. *Biomaterials*, 2010. 31(26): p. 6730-7.
67. Lumpkins, S.B., N. Pierre, and P.S. McFetridge, *A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc*. *Acta Biomater*, 2008. 4(4): p. 808-16.
68. Partington, L., et al., *Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds*. *Acta Biomater*, 2013. 9(2): p. 5251-61.
69. Luo, L., et al., *Decellularization of porcine articular cartilage explants and their subsequent repopulation with human chondroprogenitor cells*. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2015. 55: p. 21-31.

70. Moore, M.A., et al., *Decellularization of human dermis using non-denaturing anionic detergent and endonuclease: a review*. Cell Tissue Bank, 2015. 16(2): p. 249-59.
71. Pokrywczynska, M., et al., *Application of bladder acellular matrix in urinary bladder regeneration: the state of the art and future directions*. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 613439.
72. Syed, O., et al., *Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering*. Acta Biomater, 2014. 10(12): p. 5043-54.
73. Ott, H.C., et al., *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. Nat Med, 2008. 14(2): p. 213-21.
74. Jung, J.P., D.B. Bhuiyan, and B.M. Ogle, *Solid organ fabrication: comparison of decellularization to 3D bioprinting*. Biomater Res, 2016. 20(1): p. 27.
75. Yu, Y., et al., *Decellularized scaffolds in regenerative medicine*. Oncotarget, 2016.
76. Salvatori, M., et al., *Semi-xenotransplantation: the regenerative medicine-based approach to immunosuppression-free transplantation and to meet the organ demand*. Xenotransplantation, 2015. 22(1): p. 1-6.
77. Song, J.J. and H.C. Ott, *Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds*. Trends Mol Med, 2011. 17(8): p. 424-32.
78. da Costa, F.D., et al., *The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts*. Ann Thorac Surg, 2010. 90(6): p. 1854-60.
79. Sharp, M.A., et al., *A cautionary case: the SynerGraft vascular prosthesis*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2004. 27(1): p. 42-4.

80. Hashimoto, Y., et al., *Corneal Regeneration by Deep Anterior Lamellar Keratoplasty (DALK) Using Decellularized Corneal Matrix*. PLoS One, 2015. 10(7): p. e0131989.
81. Badylak, S.F., et al., *Esophageal preservation in five male patients after endoscopic inner-layer circumferential resection in the setting of superficial cancer: a regenerative medicine approach with a biologic scaffold*. Tissue Eng Part A, 2011. 17(11-12): p. 1643-50.
82. Doede, T., et al., *Unsuccessful alloplastic esophageal replacement with porcine small intestinal submucosa*. Artif Organs, 2009. 33(4): p. 328-33.
83. Lederman, E.S., et al., *A prospective, multicenter study to evaluate clinical and radiographic outcomes in primary rotator cuff repair reinforced with a xenograft dermal matrix*. J Shoulder Elbow Surg, 2016.
84. Walton, J.R., et al., *Restore orthobiologic implant: not recommended for augmentation of rotator cuff repairs*. J Bone Joint Surg Am, 2007. 89(4): p. 786-91.
85. Fitzpatrick, J.C., P.M. Clark, and F.M. Capaldi, *Effect of decellularization protocol on the mechanical behavior of porcine descending aorta*. Int J Biomater, 2010. 2010.
86. Nakayama, K.H., et al., *Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering*. Tissue Eng Part A, 2010. 16(7): p. 2207-16.
87. Rieder, E., et al., *Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. 127(2): p. 399-405.
88. Kasimir, M.T., et al., *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves*. Int J Artif Organs, 2003. 26(5): p. 421-7.
89. Mirsadraee, S., et al., *Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering*. Tissue Eng, 2006. 12(4): p. 763-73.

90. Sullivan, D.C., et al., *Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system*. *Biomaterials*, 2012. 33(31): p. 7756-64.
91. Boer, U., et al., *The effect of detergent-based decellularization procedures on cellular proteins and immunogenicity in equine carotid artery grafts*. *Biomaterials*, 2011. 32(36): p. 9730-7.
92. Cebotari, S., et al., *Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells*. *Circulation*, 2006. 114(1 Suppl): p. I132-7.
93. Shirakigawa, N., H. Ijima, and T. Takei, *Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering*. *J Biosci Bioeng*, 2012. 114(5): p. 546-51.
94. Grauss, R.W., et al., *Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003. 126(6): p. 2003-10.
95. Yang, B., et al., *Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010. 16(5): p. 1201-11.
96. Funamoto, S., et al., *The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels*. *Biomaterials*, 2010. 31(13): p. 3590-5.
97. Azhim, A., et al., *The use of sonication treatment to decellularize aortic tissues for preparation of bioscaffolds*. *J Biomater Appl*, 2014. 29(1): p. 130-141.
98. Phillips, M., E. Maor, and B. Rubinsky, *Nonthermal irreversible electroporation for tissue decellularization*. *J Biomech Eng*, 2010. 132(9): p. 091003.
99. Wainwright, J.M., et al., *Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010. 16(3): p. 525-32.

100. Lee, W., et al., *A comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity*. Int J Ophthalmol, 2014. 7(4): p. 587-93.
101. Consolo, F., et al., *A dynamic distention protocol for whole-organ bladder decellularization: histological and biomechanical characterization of the acellular matrix*. J Tissue Eng Regen Med, 2016. 10(2): p. E101-12.
102. Bolland, F., et al., *Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering*. Biomaterials, 2007. 28(6): p. 1061-70.
103. Gonzalez-Andrades, M., et al., *Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences*. Transl Vis Sci Technol, 2015. 4(2): p. 13.
104. Perea-Gil, I., et al., *In vitro comparative study of two decellularization protocols in search of an optimal myocardial scaffold for recellularization*. Am J Transl Res, 2015. 7(3): p. 558-73.
105. Schneider, C., et al., *Systematic comparison of protocols for the preparation of human articular cartilage for use as scaffold material in cartilage tissue engineering*. Tissue Eng Part C Methods, 2016.
106. Liao, J., E.M. Joyce, and M.S. Sacks, *Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet*. Biomaterials, 2008. 29(8): p. 1065-74.
107. Mussbach, F., et al., *Bioengineered Livers: A New Tool for Drug Testing and a Promising Solution to Meet the Growing Demand for Donor Organs*. Eur Surg Res, 2016. 57(3-4): p. 224-239.
108. Hodgson, M.J., et al., *Extracellular Matrix from Whole Porcine Heart Decellularization for Cardiac Tissue Engineering*. Methods Mol Biol, 2017.

109. Singelyn, J.M., et al., *Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering*. *Biomaterials*, 2009. 30(29): p. 5409-16.
110. Zou, Y. and Y. Zhang, *Mechanical evaluation of decellularized porcine thoracic aorta*. *J Surg Res*, 2012. 175(2): p. 359-68.
111. Oliveira, A.C., et al., *Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering*. *PLoS One*, 2013. 8(6): p. e66538.
112. Paniagua Gutierrez, J.R., et al., *Regenerative potential of low-concentration SDS-decellularized porcine aortic valved conduits in vivo*. *Tissue Eng Part A*, 2015. 21(1-2): p. 332-42.
113. Boccafoschi, F., et al., *Decellularized biological matrices: an interesting approach for cardiovascular tissue repair and regeneration*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015.
114. Simionescu, D.T., *Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves: challenges and perspectives*. *Expert Opin Biol Ther*, 2004. 4(12): p. 1971-85.
115. Schoen, F.J. and R.J. Levy, *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention*. *Ann Thorac Surg*, 2005. 79(3): p. 1072-80.
116. Welke, K.F., et al., *Long-term results after Carpentier-Edwards pericardial aortic valve implantation, with attention to the impact of age*. *Heart Surg Forum*, 2011. 14(3): p. E160-5.
117. Etnel, J.R., et al., *Outcome after aortic valve replacement in children: A systematic review and meta-analysis*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2016. 151(1): p. 143-52 e1-3.
118. Mohammadi, S., et al., *Surgery for right ventricle to pulmonary artery conduit obstruction: risk factors for further reoperation*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2005. 28(2): p. 217-22.

119. Oxenham, H., et al., *Twenty year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprotheses*. Heart, 2003. 89(7): p. 715-21.
120. Konertz, W., et al., *Hemodynamic characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation*. J Heart Valve Dis, 2005. 14(1): p. 78-81.
121. Bloch, O., et al., *Immune response in patients receiving a bioprosthetic heart valve: lack of response with decellularized valves*. Tissue Eng Part A, 2011. 17(19-20): p. 2399-405.
122. Kneib, C., et al., *Evaluation of humoral immune response to donor HLA after implantation of cellularized versus decellularized human heart valve allografts*. Tissue Antigens, 2012. 80(2): p. 165-74.
123. Cheung, D.Y., B. Duan, and J.T. Butcher, *Current progress in tissue engineering of heart valves: multiscale problems, multiscale solutions*. Expert Opin Biol Ther, 2015. 15(8): p. 1155-72.
124. Cebotari, S., et al., *Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report*. Circulation, 2011. 124(11 Suppl): p. S115-23.
125. Sarikouch, S., et al., *Decellularized fresh homografts for pulmonary valve replacement: a decade of clinical experience*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016. 50(2): p. 281-90.
126. Aper, T., Haverich, A., Teebken, O. E., *Der Traum vom idealen Bypassmaterial in der Gefäßchirurgie*. Gefässchirurgie, 2008. 13(2): p. 87-98.
127. Schmidt, C.E. and J.M. Baier, *Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering*. Biomaterials, 2000. 21(22): p. 2215-31.

128. Schaner, P.J., et al., *Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering*. J Vasc Surg, 2004. 40(1): p. 146-53.
129. Gui, L., et al., *Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts*. Tissue Eng Part A, 2009. 15(9): p. 2665-76.
130. Martin, N.D., et al., *In vivo behavior of decellularized vein allograft*. J Surg Res, 2005. 129(1): p. 17-23.
131. Akhyari, P., 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, 2011. 17(9): p. 915-26.
132. Momtahan, N., et al., *Strategies and processes to decellularize and recellularize hearts to generate functional organs and reduce the risk of thrombosis*. Tissue Eng Part B Rev, 2015. 21(1): p. 115-32.
133. Sanchez, P.L., et al., *Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts*. Biomaterials, 2015. 61: p. 279-89.
134. Sierad, L.N., et al., *Functional Heart Valve Scaffolds Obtained by Complete Decellularization of Porcine Aortic Roots in a Novel Differential Pressure Gradient Perfusion System*. Tissue Eng Part C Methods, 2015. 21(12): p. 1284-96.
135. Matthew, J.B. and F.R. Gurd, *Stabilization and destabilization of protein structure by charge interactions*. Methods Enzymol, 1986. 130: p. 437-53.
136. Levy, M. and A.E. Benaglia, *The influence of temperature and pH upon the rate of denaturation of ricin*. J Biol Chem, 1950. 186(2): p. 829-47.
137. Anderson, D.E., W.J. Becktel, and F.W. Dahlquist, *pH-induced denaturation of proteins: a single salt bridge contributes 3-5 kcal/mol to the free energy of folding of T4 lysozyme*. Biochemistry, 1990. 29(9): p. 2403-8.

138. Smeller, L., *Protein Denaturation on p-T Axes--Thermodynamics and Analysis*. Subcell Biochem, 2015. 72: p. 19-39.
139. Wikipedia. *Fluoreszenz*. 2016 09-21-2016 [cited 2016 09-21]; Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenz>.
140. Kapuscinski, J., *DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*. Biotech Histochem, 1995. 70(5): p. 220-33.
141. Kapuscinski, J. and B. Skoczylas, *Fluorescent complexes of DNA with DAPI 4',6-diamidine-2-phenyl indole.2HCl or DCI 4',6-dicarboxamide-2-phenyl indole*. Nucleic Acids Res, 1978. 5(10): p. 3775-99.
142. Kapuscinski, J. and W. Szer, *Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides*. Nucleic Acids Res, 1979. 6(11): p. 3519-34.
143. Flexikon. *Hämatoxylin-Eosin-Färbung*. 2016 [cited 2016 09-30]; Available from: <http://flexikon.doccheck.com/de/H%C3%A4malaun-Eosin-F%C3%A4rbung>.
144. Morphisto. *HistoAtlas*. 2008 [cited 2016 09-30]; Färbung: Movat Pentachrom nach Verhöff].
145. Borges, L.F., S.R. Taboga, and P.S. Gutierrez, *Simultaneous observation of collagen and elastin in normal and pathological tissues: analysis of Sirius-red-stained sections by fluorescence microscopy*. Cell Tissue Res, 2005. 320(3): p. 551-2.
146. Vogel, B., et al., *Determination of collagen content within picosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy*. MethodsX, 2015. 2: p. 124-34.
147. Schmidt, P.F., *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*. Kontakt & Studium. 1994, Renningen-Malmsheim: Expert-Verl. 810 S.

148. Macherauch, E.Z., H.W., *Rasterelektronenmikroskopie. Praktikum in Werkstoffkunde*, 2011: p. 289-296.
149. Araujo, J.C., et al., *Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge*. J Electron Microsc (Tokyo), 2003. 52(4): p. 429-33.
150. Wikipedia. *Anderson-Darling-Test*. 2016 [cited 2016 11-21]; Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Anderson-Darling-Test>.
151. Petersen, T.H., et al., *Tissue-engineered lungs for in vivo implantation*. Science, 2010. 329(5991): p. 538-41.
152. Gilpin, S.E., et al., *Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale*. J Heart Lung Transplant, 2014. 33(3): p. 298-308.
153. Caralt, M., et al., *Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation*. Am J Transplant, 2015. 15(1): p. 64-75.
154. Hung, S.H., et al., *Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method*. J Voice, 2013. 27(3): p. 289-94.
155. Azhim, A., et al., *Preparation of decellularized meniscal scaffolds using sonication treatment for tissue engineering*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2013. 2013: p. 6953-6.
156. Azhim, A., et al., *The use of sonication treatment to completely decellularize blood arteries: a pilot study*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2011. 2011: p. 2468-71.
157. Dahl, S.L., et al., *Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation*. Cell Transplant, 2003. 12(6): p. 659-66.

158. Kawecki, M., et al., *A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix' scaffolds and their role in regenerative medicine.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2017.
159. Cartmell, J.S. and M.G. Dunn, *Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties.* J Biomed Mater Res, 2000. 49(1): p. 134-40.
160. Cebotari, S., et al., *Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells.* Artif Organs, 2010. 34(3): p. 206-10.
161. Nichols, J.E., et al., *Production and assessment of decellularized pig and human lung scaffolds.* Tissue Eng Part A, 2013. 19(17-18): p. 2045-62.
162. Kajbafzadeh, A.M., et al., *Decellularization of Human Internal Mammary Artery: Biomechanical Properties and Histopathological Evaluation.* Biores Open Access, 2017. 6(1): p. 74-84.
163. Pellegata, A.F., et al., *Detergent-enzymatic decellularization of swine blood vessels: insight on mechanical properties for vascular tissue engineering.* Biomed Res Int, 2013. 2013: p. 918753.
164. Mathapati, S., et al., *Qualitative and quantitative detection of sodium deoxycholic acid in decellularized tissue.* Indian J Thorac Cardiovasc Surg, 2010. 26: p. 129-131.
165. Hopkinson, A., et al., *Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering.* Tissue Eng Part C Methods, 2008. 14(4): p. 371-81.
166. Prasertsung, I., et al., *Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008. 85(1): p. 210-9.

167. Negishi, J., et al., *Effect of treatment temperature on collagen structures of the decellularized carotid artery using high hydrostatic pressure*. J Artif Organs, 2011. 14(3): p. 223-31.
168. Tsuchiya, T., et al., *Influence of pH on extracellular matrix preservation during lung decellularization*. Tissue Eng Part C Methods, 2014. 20(12): p. 1028-36.
169. Helder, M.R.K., et al., *Xenoantigenicity of porcine decellularized valves*. J Cardiothorac Surg, 2017. 12(1): p. 56.
170. Wilson, S.L., et al., *Corneal Decellularization: A Method of Recycling Unsuitable Donor Tissue for Clinical Translation?* Curr Eye Res, 2015: p. 1-14.
171. Penn, M.S., et al., *Visualization and quantification of transmural concentration profiles of macromolecules across the arterial wall*. Circ Res, 1990. 67(1): p. 11-22.

10 ANHANG

Temperaturmesswerte G₂:

Tabelle 10-1: Temperaturmesswerte [°C] G₂. Da je drei AW pro Durchgang dezellularisiert wurden, waren zwei Messreihen je Inkubationszeit erstellt worden. Der Mittelwert der gemessenen Temperatur wich maximal um $0,9 \pm 1,3$ °C von den gewünschten 37 °C ab.

Zeit [min]	4 h		4 h Zyklus		8 h		8 h Zyklus	
	AW 1-3	AW 4-6	AW 1-3	AW 4-6	AW 1-3	AW 4-6	AW 1-3	AW 4-6
0	34°C	32°C	35°C	35°C	34°C	35°C	36°C	35°C
15	37°C	35°C	35°C	36°C	36°C	37°C	36°C	36°C
30	37°C	37°C	36°C	36°C	37°C	37°C	37°C	37°C
45	37°C	37°C	37°C	38°C	37°C	37°C	37°C	37°C
60	37°C	36°C	38°C	37°C	38°C	38°C	37°C	38°C
75	37°C	36°C	37°C	38°C	37°C	38°C	37°C	38°C
90	37°C	35°C	38°C	37°C	39°C	38°C	38°C	38°C
105	37°C	36°C	38°C	38°C	37°C	38°C	38°C	37°C
120	38°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
135	37°C	36°C	37°C	37°C	38°C	37°C	37°C	37°C
150	37°C	37°C	38°C	38°C	37°C	38°C	38°C	38°C
165	37°C	38°C	37°C	37°C	37°C	38°C	37°C	38°C
180	36°C	36°C	36°C	37°C	39°C	37°C	37°C	38°C
195	36°C	36°C	38°C	38°C	38°C	37°C	37°C	37°C
210	35°C	35°C	37°C	37°C	39°C	38°C	37°C	37°C
225	37°C	37°C	38°C	37°C	37°C	38°C	38°C	37°C
240	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	38°C	37°C	37°C
255					37°C	37°C	36°C	37°C
270					39°C	36°C	37°C	36°C
285					37°C	37°C	38°C	37°C
300					39°C	38°C	38°C	38°C
315					37°C	38°C	37°C	36°C
330					40°C	38°C	38°C	37°C
345					39°C	39°C	38°C	37°C

360					39°C	38°C	37°C	38°C
375					38°C	37°C	37°C	36°C
390					37°C	37°C	36°C	36°C
405					38°C	38°C	37°C	36°C
420					35°C	37°C	37°C	37°C
435					37°C	37°C	38°C	37°C
450					37°C	37°C	37°C	37°C
465					37°C	37°C	38°C	36°C
480					37°C	37°C	37°C	37°C
MW	36,6	36,1	37,0	37,1	37,5	37,4	37,2	37,0
±s	±0,9	±1,3	±1,0	±0,8	±1,2	±0,7	±0,6	±0,8

pH-Messwerte:

Tabelle 10-2: pH-Messwerte aus G_c, G₁, G₂ während und nach 4 h kontinuierlicher DZ. Da nur drei AW pro Durchgang dezellularisiert wurden, waren zwei Messreihen pro Gruppe erstellt worden.

	G _c		G ₁		G ₂	
Zeit	AW 1-3	AW 4-6	AW 1-3	AW 4-6	AW 1-3	AW 4-6
0 h	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67
1 h	pH = 7,63	pH = 7,63	pH = 7,64	pH = 7,65	pH = 7,65	pH = 7,65
2 h	pH = 7,61	pH = 7,62	pH = 7,62	pH = 7,63	pH = 7,63	pH = 7,63
3 h	pH = 7,59	pH = 7,60	pH = 7,62	pH = 7,62	pH = 7,60	pH = 7,61
4 h	pH = 7,58	pH = 7,59	pH = 7,61	pH = 7,62	pH = 7,57	pH = 7,59
Δ pH (0→4h)	-1,2 %	-1,0 %	-0,8 %	-0,7 %	-1,3 %	-1,0 %

Tabelle 10-3: pH-Messwerte aus G_c, G₁, G₂ während und nach 4 h zyklischer DZ.

	G _c		G ₁		G ₂	
Zeit	AW 1-3	AW 4-6	AW 1-3	AW 4-6	AW 1-3	AW 4-6
0 h	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67
1 h	pH = 7,63	pH = 7,63	pH = 7,64	pH = 7,64	pH = 7,65	pH = 7,65
2 h	pH = 7,62	pH = 7,62	pH = 7,62	pH = 7,63	pH = 7,63	pH = 7,62
Wechsel der DZ Lösung: Ausgangs pH 7,67						
3 h	pH = 7,63	pH = 7,63	pH = 7,65	pH = 7,64	pH = 7,63	pH = 7,62
4 h	pH = 7,62	pH = 7,62	pH = 7,64	pH = 7,63	pH = 7,63	pH = 7,60

Tabelle 10-4: pH-Messwerte aus G_c, G₁, G₂ während und nach 8 h zyklischer DZ.

	G _c		G ₁		G ₂	
Zeit	AW 1-3	AW 4-6	AW 1-3	AW 4-6	AW 1-3	AW 4-6
0 h	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67	pH = 7,67
1 h	pH = 7,62	pH = 7,62	pH = 7,63	pH = 7,64	pH = 7,66	pH = 7,65
2 h	pH = 7,61	pH = 7,61	pH = 7,61	pH = 7,62	pH = 7,64	pH = 7,64
Wechsel der DZ Lösung: Ausgangs pH 7,67						
3 h	pH = 7,64	pH = 7,62	pH = 7,65	pH = 7,63	pH = 7,63	pH = 7,63
4 h	pH = 7,62	pH = 7,60	pH = 7,64	pH = 7,62	pH = 7,61	pH = 7,61
Wechsel der DZ Lösung: Ausgangs pH 7,67						
5 h	pH = 7,64	pH = 7,63	pH = 7,65	pH = 7,64	pH = 7,61	pH = 7,62
6 h	pH = 7,62	pH = 7,60	pH = 7,64	pH = 7,63	pH = 7,61	pH = 7,61
Wechsel der DZ Lösung: Ausgangs pH 7,67						
7 h	pH = 7,66	pH = 7,65	pH = 7,66	pH = 7,66	pH = 7,62	pH = 7,63
8 h	pH = 7,66	pH = 7,65	pH = 7,66	pH = 7,66	pH = 7,60	pH = 7,62

DAPI Ergebnisse:

Tabelle 10-5: DAPI EDT [μm] an den äußeren (EDT_a) und inneren (EDT_i) Oberflächen der AW aus G_c .

G_c								
AW Nr.	4 h		4 h Zyklus		8 h		8 h Zyklus	
	EDT_a	EDT_i	EDT_a	EDT_i	EDT_a	EDT_i	EDT_a	EDT_i
1	252,5	164	318,9	217,7	430,7	185,3	671,4	379,8
2	237,2	100,3	277,2	189,8	393,6	149,8	514,5	346,3
3	187,4	189,3	307,4	159,3	465,6	272,6	643,4	334
4	192,4	134,8	285	159,3	451,4	171,4	569,6	350,6
5	211,9	169,3	311,4	190,1	570,6	269,5	405,4	385,8
6	197	198	328,3	163,5	403,9	339,1	481,1	254,4
MW	213,1	159,3	304,7	180,0	452,6	231,3	547,6	341,8
$\pm s$	24,1	33,2	18,1	21,4	58,3	67,2	91,9	43,2

Tabelle 10-6: DAPI EDT [μm] an den äußeren (EDT_a) und inneren (EDT_i) Oberflächen der AW aus G_1 .

G_1								
AW Nr.	4 h		4 h Zyklus		8 h		8 h Zyklus	
	EDT_a	EDT_i	EDT_a	EDT_i	EDT_a	EDT_i	EDT_a	EDT_i
1	258	179,5	331,5	216,2	506,6	346,4	510,9	359,7
2	253,3	186,9	388,1	165,5	466,9	139,5	533,7	379
3	306,6	166,5	299,6	221,3	561,5	224,3	430,1	344,4
4	254,4	184,7	326,5	177,8	509,5	146,7	537,5	373,4
5	217,1	217,7	380,3	115,4	512,6	418,1	436,7	390,3
6	229,7	186,3	379,8	178,1	528,4	348,3	513,4	376,7
MW	253,2	186,9	351,0	179,1	514,3	270,6	493,7	370,6
$\pm s$	28,1	15,4	33,4	35,1	28,2	106,6	43,8	14,8

Tabelle 10-7: DAPI EDT [μm] an den äußeren (EDT_a) und inneren (EDT_i) Oberflächen der AW aus G_2 .

G_2								
AW Nr.	4 h		4 h Zyklus		8 h		8 h Zyklus	
	EDT_a	EDT_i	EDT_a	EDT_i	EDT_a	EDT_i	EDT_a	EDT_i
1	326,8	177,3	344,4	233,5	499,4	387	616,4	354,6
2	283,4	173,4	384	255,8	504,1	318,6	623,1	419,1
3	337,2	309	432,3	273,2	554,5	370	566,3	392,7
4	318,2	139,4	367,1	244,9	519,2	264,8	583,5	422,3
5	309	140	328,7	201,2	483,1	145,4	669,4	402,9
6	328,1	132,4	365,1	255,9	557,2	359,9	543,7	315,2
MW	317,1	178,6	370,3	244,1	519,6	307,6	600,4	384,5
$\pm s$	17,4	60,8	32,8	22,6	27,7	82,9	41,2	38,1

Tabelle 10-8: DAPI EDT [μm] an den äußeren (EDT_a) und inneren (EDT_i) Oberflächen der AW aus G_3 und G_{c-24h}

G_3			G_c	
24 h Zyklus		AW Nr.	24 h	
EDT_a	EDT_i		EDT_a	EDT_i
842,6	524,7	1	567,8	488,9
831	530,3	2	635,8	432,8
685,6	594,8	3	720,7	482,5
874,3	562,4	4	681,2	463
825	549,6	5	549,4	472,3
937,1	596,2	6	673,4	400,6
832,6	559,7	MW	638,1	456,7
75,8	28,2	$\pm s$	61,6	30,8

Lösungen:

Medium	Art.-Nr.	Herstellerfirma
Acetone for analysis	1.00014.5000	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Aqua destillata (Ampuwa)	1214482	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, GER
Anti-Anti (100x) Antibiotic Antimycotic	15240-062	Gibco® by Life Technologies, Darmstadt, GER
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	D9542-5MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Eosin Y solution, alcoholic	HT110116-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Ethanol 30/ 50/ 70/ 80/ 96/ 99/ 100 Vol.-%, vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern
Glutaraldehydlösung 25 Gew. %	G400-4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
HCL	1.09970.0001	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Mayer's Hämalunlösung	1.09249.0500	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Methanol for analysis	1.06009.2500	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Sodium cacodylate trihydrate (Na-CaCO)	20838	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Natriumchlorid-Lösung	809121	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, GER
PBS Dulbecco w/o CA ²⁺ Instamed 9,55g/L	L 182-50	Biochrom GmbH, Berlin, GER
Roti®-Histofix Formaldehydlösung 4,5%	2213.5	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
Roti-Histol	6640.4	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
Sodiumdeoxycholat	30970-500G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Sodiumdodecylsulfat ≥99,5%, Blotting-Grade	0183.3	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
Sudanschwarz B (C.I. 26150) für die Mikroskopie	0292.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
Xylol (Isomere) >98%, rein, für die Histologie	9713.3	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER

Lösungszusammensetzung:

Lösung	Bestandteile	Menge
DAPI Lösung, c = 0,1 µg/ml	DAPI	1 µg
	PBS	10 ml
Fix II Lösung	Aqua destillata	912 ml
	Glutaraldehydlösung 25 Gew. %	86,5 ml
	HCL	1,5 ml
	Na-CaCO	11,3 g
Hämalaunlösung für H&E Färbung	Mayer's Hämalaunlösung	50 ml
	PBS	150 ml
Methanol-Aceton	Methanol	100 ml
	Aceton	100 ml
PBS	PBS Pulver	9,55 g
	Aqua destillata	1 l

Kommerzielle Färbekits:

Färbekit	Bestandteile	Art.-Nr.	Herstellerfirma
Movat Pentachrom (Original) Art.-Nr. 12057	Alcianblau 1 Vol.-%	10126	MORPHISTO® Evolutionforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, GER
	Alkalischer Alkohol	10132	
	WEIGERT Stammlösung A/B	10225 A/B	
	Eisen (III)-Chlorid	12019	
	Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	10156	
	Phosphorwolframsäure	10324	
	Safron du Gatinais	10369	
	Natriumthiosulfat	10288	
Essigsäure 1 Vol.-%	10180		
Pikro-Siriusrot für Kollagen I & III Nachweis Art.-Nr. 13425	WEIGERT Stammlösung A/B	10225 A/B	MORPHISTO® Evolutionforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, GER
	Pikro-Siriusrot	13422	
	Essigsäure 30 Vol.-%	13428	

Geräte:

Gerät/ Hilfsmittel	Modellbezeichnung	Herstellerfirma
Fluoreszenzmikroskop	AxioObserver	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
PC Software Fluoreszenzauswertung	AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
PC Software Histologieauswertung	Ascent software version 2.6	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Kritisch-Punkt-Trockner	CPD 30	BalTec, Schalksmühle, GER
Lichtmikroskop	Leica DMR	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar GER
Paraffinstreckbad	Typ 25900	MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster, GER
pH-Meter	inoLab pH Level 1	WTW, Weilheim, GER
Pumpe aus G ₁ und G ₂	Eden 114 Aquariumpumpe, 11 W	PfG GmbH, Hörstel, GER
Pumpe aus G ₃	EDEN 155 Aquariumpumpe, 80 W	PfG GmbH, Hörstel, GER
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss EVO LS10	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
Schlittenmikrotom	HM 400 R	Microm International GmbH, Walldorf, GER
Schüttel-Inkubator	Inkubationshaube TH 15	Edmund Bühler, Hechingen, GER
Sputter Coater	SCD 50	BalTec, Schalksmühle, GER
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner USC600T	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Wasserbad	Julabo SW22	JULABO GmbH, Seelbach, GER
Wärmeschrank	WTC	Binder, Tuttlingen, GER

Hilfsmittel/ Verbrauchsmaterial:

Hilfsmittel/ Verbrauchsmaterial	Modellbezeichnung	Herstellerfirma
Aquarellpinsel	Serie 1520L	Lab Logistics Group GmbH, Meckenhelm, GER
Borstenpinsel	Serie 7179L	Lab Logistics Group GmbH, Meckenhelm, GER
Cryomatrix	Shandon Cryomatrix	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Einbettkassetten		Lab Logistics Group GmbH, Meckenhelm, GER
Eindeckgläser 24 x 50 mm		Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, GER
Eindeckmedium	Leica CV Mount	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, GER
Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm	Thermo SCIENTIFIC, Superfrost Ultra Plus®	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, GER

VORVERÖFFENTLICHUNG

Ein Teil der Dissertationsarbeit wurde 2016 bereits im *Journal of Biomedical Materials Research: Part B – Applied Biomaterials* sowie im Rahmen der *Cardiovascular Research days* in Heidelberg und des *European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS)* in Uppsala, Schweden in Form eines Postervortrags veröffentlicht. Darüber hinaus wurden Teile der Arbeit 2017 erneut im Rahmen eines Postervortrags auf dem *European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2017* in Davos, Schweiz vorgestellt.

Starnecker, F, König, F, Hagl, C, Thierfelder, N, 2016. *Tissue-engineering acellular scaffolds – The significant influence of physical and procedural decellularization factors*. *Journal of Biomedical Materials Research: Part B – Applied Biomaterials*, 2018 Jan; 106 (1): p. 153-162. Epub 2016 Nov 29.

Starnecker F, Thierfelder N., Hagl C., König F., *Tissue-engineering of acellular scaffolds – The significant influence of physical and procedural decellularization factors*. Poster – *Cardiovascular Research days*, Heidelberg, 2016.

Starnecker F, Thierfelder N., Hagl C., König F., *Tissue-engineering of acellular scaffolds – The significant influence of physical and procedural decellularization factors*. Poster – *European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS)*, Uppsala, Sweden, 2016.

Thierfelder N., **Starnecker F**., Lee JS., Helm M., Yniguez F., Steinl B., Bezuidenhout D., Hagl C., König F., *Where to go in Cardiovascular Research? A comprehensive Evaluation of different Tissue Engineering and Regenerative Approaches*. Poster – *European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS)*, Davos, Switzerland, 2017.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Christian Hagl bedanken, in der unter seiner Leitung stehenden Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München promoviert haben zu dürfen. Ohne die großzügige Unterstützung der Arbeitsgruppe Cardiovascular Tissue Engineering, welcher ich in den vergangenen Jahren angehören durfte, wäre die Promotion nicht möglich gewesen.

Größter Dank gilt meinen beiden Betreuern, Herrn Dr. med. Nikolaus Thierfelder und Herrn Dipl.-Ing. Fabian König. Von Beginn an ermutigten mich die beiden zu selbstständigem Denken und ermöglichten es mir dadurch, stetig an meinen Aufgaben zu wachsen. Gleichzeitig wurde ich, vor allem im Einarbeitungsprozess und im Verlauf bei aufkommenden Schwierigkeiten, nie alleine gelassen und konnte mich immer auf ihre Hilfe und ihren Rat verlassen. Besonders gut in Erinnerung wird mir die Verfassung des Papers bleiben. Durch deren stets konstruktive Kritik und mit Unterstützung der beiden gelang es Stück für Stück eine sehr schöne Abhandlung zu meiner Arbeit zu verfassen. Besonders hervorheben möchte ich hierbei die von Herrn Dipl.-Ing. Fabian König erstellten Grafiken, welche einen bedeutenden Teil des Papers ausmachten. Mein persönlicher Höhepunkt war selbstverständlich die abschließende Veröffentlichung im Journal of Biomedical Materials Research: Part B – Applied Biomaterials, welche die erste Veröffentlichung meiner medizinischen Laufbahn darstellte. Auch bei der Verfassung der Dissertationsschrift schafften sie es, mir immer wieder neues Wissen und nützliche Fertigkeiten für meine wissenschaftliche Arbeitsweise zu vermitteln. Dabei erfuhr ich selbst als Herr Dr. med. Nikolaus Thierfelder beruflich ein Jahr in Südafrika verbrachte, eine engere Betreuung als viele medizinische Doktorandinnen/ -en während ihrer gesamten Promotionsarbeit.

Ich bin der Überzeugung, dass Herr Dr. med. Nikolaus Thierfelder und Herr Dipl.-Ing. Fabian König mein wissenschaftliches Verständnis und meine medizinische Ausbildung entscheidend geprägt haben. Dafür möchte ich mich sehr herzlich bei ihnen bedanken und zum Ausdruck bringen wie sehr ich die Zeit in ihrer Arbeitsgruppe genossen habe.

Neben meinen Betreuern gilt auch unseren aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen Frau Ulrike Haas, Frau Eike Petersen und Frau Barbara Steinl großer Dank. Zu Beginn

meiner Tätigkeit lehrte mich Frau Haas die Vorbereitung der REM Proben sowie die Herstellung und anschließende Färbung von Paraffinschnitten. Zusammen mit Frau Steinl vermittelte sie mir darüber hinaus die Verhaltens- und Arbeitsweisen im Labor. Besonders hervorheben möchte ich Frau Eike Petersens großes Engagement. Bereits nach kurzer Einarbeitungszeit stand sie mir bei der Erlernung und Durchführung sämtlicher etablierter Methoden des Labors zur Seite. Insbesondere die Durchführung der Fluoreszenzfärbungen wäre ohne Frau Petersens Hilfe nicht so erfolgreich möglich gewesen. Darüber hinaus erprobte und verbesserte sie kontinuierlich unsere Auswertemethoden und war bei Schwierigkeiten stets mit konstruktiven Vorschlägen und tatkräftiger Unterstützung zur Stelle. Für ihren großen Anteil am Erfolg der Promotionsarbeit, möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Den Mitarbeiterinnen des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung der Universität München gilt ebenso großer Dank für ihre Unterstützung bei der histologischen Probenaufarbeitung.

Die abschließenden Worte meiner Dissertation will ich mich meinen Eltern und Geschwistern widmen. Nur deren kontinuierliche Unterstützung während des Studiums, ermöglichte es mir, diese Promotionsarbeit zu beginnen und zu vollenden. Für all die ermutigenden und anspornenden Gespräche danke ich Ihnen von ganzem Herzen. Ich bin überzeugt, dass meine Familie großen Anteil am Erfolg dieser Arbeit trägt.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand